FRANCIELLI MAHNIC DE VASCONCELLOS

"Estudo do padrão de adesão agregativa de *Escherichia coli* do sorotipo O142: H34"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

São Paulo
2014

FRANCIELLI MAHNIC DE VASCONCELLOS

"Estudo do padrão de adesão agregativa de *Escherichia coli* do sorotipo O142: H34"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Vasconcellos, Francielli Mahnic de.
Estudo do padrão de adesão agregativa de *Escherichia coli* do sorotipo O142:H34 / Francielli Mahnic de Vasconcellos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Caracterização molecular de fatores de virulência de *Escherichia coli* diarreiogênicas.

Versão do título para o inglês: Study of the aggreggative adherence pattern of *Escherichia coli* from serotype O142:H34.

1. *Escherichia coli* 2. Diarreia infantil 3. Virulência 4. Bactérias patogênicas 5. Bacteriologia molecular 6. Mutagênese I. Elias Junior, Prof. Dr. Waldir Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0116/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Francielli Mahnic de Vasconcellos.

Título da Tese: Estudo do padrão de adesão agregativa de *Escherichia coli* do sorotipo O142:H34.

Orientador(a): Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **419/10** referente ao projeto intitulado: ***"Caracterização da adesina responsável pelo padrão de adesão agregativa de Escherichia coli do sorotipo 0142:H34"*** sob a responsabilidade de **Francielli Mahnic de Vasconcellos,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 21 de setembro de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico

À minha querida e amada família,

por todo empenho, amor e dedicação empenhados.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Junior, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação e confiança depositados em mim. Por todos esses anos de convívio, em que sempre exigiu o melhor, e desta forma contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Dra. Roxane Fontes Piazza pela contribuição científica e pela análise dos dados estatísticos.

À Dr. Marcia Regina Franzolin pela colaboração e disposição em ajudar.

À Dra. Cecília M. Abe pelas colaborações e fotos de microscopia eletrônica.

À Dra. Claudia Trigo pelas análises de sequenciamento.

À Dra. Silvia Yumi Bando pela análise dos genes e construção da árvore filogenética.

Aos amigos não só de bancada, mas também de baladas, reuniões, chás, cafés.....enfim, pessoas em quem posso contar em todos os momentos; Afonso G. Abreu Jr, Fernanda B. Andrade, Fernando Henrique Martins, Kamila N. de Oliveira, Ludmila B. da Silva.

Ao Dr. Roberto Nepomuceno pela ajuda e por compartilhar seu conhecimento para a melhor condução do trabalho.

Aos amigos Hebert Culler e Renato Ruiz pela amizade, sugestões e conhecimentos trocados que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Às "meninas do 3ºandar", pelas conversas, colaborações, pela tarde de doces e por todos os momentos de descontração.

Às queridas amigas Eloiza, Renée, Simone, Karla, Gisele, Franciele, Luziane, Karilane e Aline que caminharam comigo, tornando mais leve e fácil esta jornada.

À todos os amigos e funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

Aos meus tios Laudemir e Mary pelo apoio inicial, convivência, por todo o zelo e preocupação.

Ao meu amado noivo, seu incentivo e amor foram fundamentais.

À todas àqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2010/05462-4.

RESUMO

VASCONCELLOS, F. M. **Estudo do padrão de adesão agregativa de *Escherichia coli* do sorotipo O142:H34.** 2014. 112 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Escherichia coli enteropatogênica é um dos patótipos de *E. coli* diarreiogênica (EcD), importante agente de diarreia aguda na infância, principalmente em países em desenvolvimento. Cepas desse patótipo induzem uma alteração histopatológica no epitélio intestinal denominada lesão *attaching and effacing* (A/E). A classificação de EPEC nos subgrupos típica e atípica é baseada na presença ou ausência do plasmídeo *E. coli adherence fator* (pEAF), respectivamente. A tipagem do antígeno somático (O) das cepas de EPEC associadas à diarreia levou à definição de 12 sorogrupos clássicos de EPEC, dentre os quais está o sorogrupo O142. Um estudo prévio de caracterização de EPEC do sorogrupo O142 descreveu uma cepa do sorotipo O142:H34 (Ec48/66) que apresentava como características a presença do gene *eae* (o qual codifica a adesina intimina de EPEC), a ausência do plasmídeo pEAF (determinante de EPEC típica), a reatividade com o fragmento sonda CVD432 (indicativo do plasmídeo de virulência de *E. coli* enteroagregativa, ou EAEC) e a expressão do padrão de adesão agregativa (característica de EAEC). Essa cepa apresenta uma inusitada combinação de genes de virulência de EPEC e EAEC, tornando a sua classificação dificultosa. Além disso, a adesina que medeia a adesão agregativa dessa cepa não foi caracterizada. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel de estruturas fimbriais no estabelecimento do padrão de adesão agregativa da cepa Ec46/88 de *E. coli* do sorotipo O142:H34, bem como avaliar a sua classificação. A cepa Ec46/88 mostrou-se capaz de aderir no padrão agregativo nas linhagens HeLa, HEp-2, HT-29 e T84, além de causar a lesão A/E em células HeLa e HT-29. A pesquisa de diversos fatores de virulência de EAEC e de outros patótipos de *E. coli* detectou a presença de *aggDBCA*, os quais compõem o operon que codifica a adesina AAF/I de EAEC, e de *ecpRABCDE*, que codificam a fímbria *E. coli common pilus* (ECP). O operon *agg* foi sequenciado mostrando alta identidade (96%) de *aggDBC* com os mesmos genes presentes na EAEC 17-2 e de *aggA* (99%) com um gene que codifica a variante $AggA_{457}$. Os genes do operon *ecp* apresentaram alta identidade (99%) com o mesmo operon da EPEC E2348/69. Mutantes nos genes que codificam os *ushers* de AAF/I e ECP (*aggC* e *ecpC*, respectivamente) foram obtidos. A análise da interação dos mesmos com células HeLa mostrou a manutenção da adesão agregativa e da capacidade de causar a lesão A/E em ambos. Entretanto, o mutante em *aggC* apresentou diminuição significativa do número de bactérias aderidas. Análises filogenéticas dessa cepa, em relação a outros patótipos de EcD, a posicionaram em um grupo constituído predominantemente por EPEC. Os dados obtidos permitem concluir que a cepa Ec48/66 é uma EPEC atípica, com capacidade de causar a lesão A/E *in vitro* e que expressa o padrão de adesão agregativo, o qual é parcialmente dependente de uma variante da fímbria AAF/I, mas não da fímbria ECP.

Palavras-chave: Adesão. *Escherichia coli* enteropatogênica. Fímbria AAF/I. Fímbria ECP.

ABSTRACT

VASCONCELLOS, F. M. **Study of the aggreggative adherence pattern of *Escherichia coli* from serotype O142:H34.** 2014. 112 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Enteropathogenic *Escherichia coli* is one of the diarrheagenic *E. coli* (DEC) pathotypes, an important agent of acute diarrhea in children, especially in developing countries. Strains of this pathotype induce histopathological changes in the intestinal epithelium known as attaching and effacing (A/E) lesion. The classification of EPEC in the subgroups typical and atypical is based on the presence or absence of the plasmid *E. coli* adherence factor (pEAF), respectively. Somatic antigen (O) typing of EPEC strains associated with diarrhea led to the definition of 12 classical EPEC serogroups, among which is the serogroup O142. A previous study characterizing EPEC O142 described a strain of serotype O142:H34 (Ec48/66) presenting some important characteristics: the presence of the *eae* gene (which encodes the adhesin intimin of EPEC), the absence of the pEAF (determinant of typical EPEC), reactivity with the probe fragment CVD432 (indicative of the virulence plasmid of enteroaggregative *E. coli*, or EAEC) and the expression of the aggregative adherence pattern (characteristic of EAEC). This strain has an unusual combination of EPEC and EAEC virulence genes, making difficult its classification. Furthermore, the adhesin mediating the aggregative adherence othis strain was not characterized. Thus, the present study aimed to evaluate the role of fimbrial structures in the establishment of the aggregative adherence pattern of *E. coli* strain serotype O142:H34 and evaluate its classification. The strain Ec46/88 was able to adhere to HeLa, HEp-2, HT-29 and T84 cell in the aggregative adherence pattern, as well as to cause the A/E lesion in HeLa and HT-29 cells. A survey of several virulence factors of EAEC and other *E. coli* pathotypes detected the presence of *aggDBCA*, which comprise the operon encoding the EAEC AAF/I fimbriae, and *ecpRABCDE*, which encode the *E. coli* common pilus (ECP). The *agg* operon was sequenced exhibiting high identity (96%) of *aggDBC* with the same genes present in EAEC 17-2, and *aggA* (99%) with a gene encoding the variant $AggA_{457}$. The genes of the *ecp* operon showed high identity (99%) with the same operon of EPEC E2348/69. Mutants in the genes encoding AAF/I and ECP ushers (*aggC* and *ecpC*, respectively) were obtained. The analysis of the interaction of both mutants with HeLa cells showed the maintenance of the aggregative adherence and the ability to cause the A/E lesion. However, the *aggC* mutant presented significant decrease in the number of adherent bacteria. Phylogenetic analysis in relation to other DEC pathotypes situated this strain in the group consisting predominantly of EPEC. The data obtained indicated that the Ec48/66 strain is an atypical EPEC able to cause the A/E lesion *in vitro* and to express the aggregative adherence pattern, which is partially dependent on a variant of AAF/I fimbriae, but not on ECP fimbriae.

Key words: Adhesion. Enterophatogenic *Escherichia coli*. AAF/I fimbriae. ECP fimbriae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação das *E. coli* diarreiogênicas.....18

Figura 2 - Fotomicrografia de uma lesão *attaching and effacing*.....26

Figura 3 - Padrões de adesão em células HeLa apresentados por cepas de aEPEC.....29

Figura 4 - Esquema de construção dos iniciadores para sequenciamento do operon *aggDCBA*.....49

Figura 5 – Esquema de construção dos iniciadores para sequenciamento do operon *ecpRABCDE*.....49

Figura 6 - Ensaios de adesão e FAS com a cepa Ec46/88 em diferentes linhagens celulares.....57

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura da interação da cepa Ec46/88 com células HeLa.....59

Figura 8 - Detecção do gene *aatA* na cepa Ec46/88.....61

Figura 9 - Detecção dos genes *aggB, aggD* e *aggC* na cepa Ec46/88.....61

Figura 10 - Árvore filogenética de 46 amostras de *E. coli* diarreiogênicas.....65

Figura 11 - Perfil plasmideal da cepa Ec46/88.....66

Figura 12 - *Southern blot* utilizando os genes *aggA*, *aggC* e *aggR* como sondas genéticas.....67

Figura 13 - *Southern blot* utilizando os genes *aatA* como sonda genética.....69

Figura 14 – Esquema dos genes do operon *agg* sequenciados da cepa Ec46/88.....70

Figura 15 - Esquema dos genes do operon *ecp* sequenciados da cepa Ec46/88.....71

Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da amplificação dos fragmentos dos genes de interesse na cepa selvagem e respectivos mutantes.....73

Figura 17 - Curvas de crescimento da cepa Ec46/88 em comparação com cepas mutantes Ec46/88Δ*aggC* e Ec46/88Δ*ecpC*.....74

Figura 18 - Ensaios de adesão em células HeLa da cepa Ec46/88 e seus mutantes Ec46/88Δ*ecpC* e Ec46/88Δ*ecpC*.....75

Figura 19 - Gráfico dos valores da quantificação dos ensaios de adesão em células HeLa da cepa Ec46/88 e seus mutantes Ec46/88Δ*ecpC* e Ec46/88Δ*ecpC*.....76

Figura 20 - Ensaios de FAS em células HeLa da cepa Ec46/88 e seus mutantes Ec46/88Δ*ecpC* e Ec46/88Δ*ecpC*.....77

Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura da interação das cepas Ec46/88, Ec46/88Δ*aggC* e Ec46/88Δ*ecpC* com células HeLa.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sorotipos frequentemente detectados em cepas de EPEC típicas e atípicas.....31

Tabela 2 - Marcadores de virulência de EPEC e EHEC pesquisados por reações de PCR.....40

Tabela 3 - Marcadores de virulência de EAEC pesquisados por reação de PCR.....41

Tabela 4 - Genes das fímbrias AAF de EAEC pesquisados por reações de PCR.....42

Tabela 5 - Tabela dos genes de fímbrias de *E. coli* patogênicas pesquisados por reação de PCR.....43

Tabela 6 – Tabela dos genes utilizados para a análise filogenética.....47

Tabela 7 - Tabela dos genes utilizados para sequenciamento do operon da fimbria AAF/I da cepaEc46/88.....50

Tabela 8 - Tabela de genes utilizados para sequenciamento do operon da fimbria ECP da cepa Ec46/88.....50

Tabela 9 - Iniciadores e plasmídeos utilizados para a mutagênese.....54

Tabela 10 - Detecção dos marcadores de virulência de EPEC e EHEC na cepa Ec46/88.....56

Tabela 11- Detecção dos genes de virulência de EAEC na cepa Ec46/88.....60

Tabela 12 - Detecção dos genes de adesinas fimbriais de patótipos de *E. coli* na cepa Ec46/8.....62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....16
1.1 *Escherichia coli* diarreiogênicas.....16
1.2 *E. coli* enteroagregativa.....19
1.3 *E. coli* enteropatogênica.....26
1.4 *E. coli* sorotipo O142:H34.....31
2 OBJETIVOS.....34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....35
3.1 Cepas bacterianas.....35
3.2 Ensaios de interação com células epiteliais cultivadas.....35
***3.2.1* Cultivo e preparo das placas de células epiteliais**.....35
***3.2.2* Ensaios de adesão qualitativo e quantitativo**.....36
***3.2.3* Teste de FAS (*fluorescent actin staining*)**.....37
***3.2.4* Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**.....38
3.3 Caracterizações genotípicas.....38
***3.3.1* Técnicas de biologia molecular**.....38
***3.3.2* Reação em cadeia da polimerase (PCR)**.....38
***3.3.3* Análise filogenética**.....46
***3.3.4* Análise do perfil plasmidial**.....47
3.3.5* Hibridização por *Southern blot.....47
***3.3.6* Sequenciamento dos genes dos operons que codificam as fímbrias AAF/I e ECP**..48
3.4 Mutagênese sítio dirigida.....51
***3.4.1* Obtenção dos mutantes nos genes *aggC* e *ecpC* na amostra Ec46/88**.....51
***3.4.2* Análises fenotípicas dos mutantes**.....54
4 RESULTADOS.....56
4.1 Análises fenotípicas e genotípicas da cepa Ec46/88.....56
***4.1.1* Pesquisa dos marcadores de virulência de EPEC e EHEC**.....56
***4.1.2* Análises de interação com células epiteliais cultivadas**.....56
***4.1.3* Pesquisa de marcadores de virulência de EAEC**.....59
***4.1.4* Pesquisa de adesinas fimbriais de *E. coli* patogênicas**.....62
***4.1.5* Análise filogenética**.....63

4.1.6 **Análise do perfil plasmidial e localização dos genes do operon agg na cepa Ec46/88**.....66
4.2 Sequenciamento dos genes que compõem o operon *agg* da cepa Ec46/88.....69
4.3 Sequenciamento dos genes que compõem o operon *ecp* da cepa Ec46/8.....70
4.4 Papel das fímbrias AAF/I e ECP na adesão agregativa da cepa Ec46/88.....72
4.4.1 **Obtenção dos mutantes Ec46/88Δ*aggC* e Ec46/88Δ*ecpC***.....72
4.4.2 **Análises fenotípicas dos mutantes Ec46/88Δ*aggC* e Ec46/88Δ*ecpC***.....73
5 DISCUSSÃO.....80
6 CONCLUSÕES.....91
REFERÊNCIAS.....92

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Escherichia coli* diarreiogênica

A doença diarreica é considerada um dos principais problemas de saúde mundial. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a diarreia está entre as principais causas de mortalidade infantil, afetando cerca de 2 milhões de crianças a cada ano em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2009). No Brasil a doença também é uma das maiores causas de morte de crianças abaixo de 5 anos de idade (BRYCE et al., 2005). Segundo dados da OMS, rotavírus e *E. coli* são os dois agentes etiológicos mais comuns da diarreia nos países em desenvolvimento, responsáveis por metade dos óbitos associados a essa patologia (LANATA et al., 2013).

As *E. coli* são encontradas na microbiota intestinal do homem e de outras espécies animais de sangue quente (DRASAR; HILL, 1974). Devido a sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes, estão presentes em variados habitats, tanto terrestres quanto aquáticos (MARTINEZ; TRABULSI, 2008). Geralmente as *E. coli* estão confinadas no lúmen intestinal como organismos simbiontes. Entretanto, em situações adversas onde o hospedeiro encontra-se debilitado e as barreiras intestinais são violadas, cepas não patogênicas podem causar infecções. No homem as infecções causadas por *E. coli* podem ser intestinais e extraintestinais, dentre as quais destacam-se epidemiologicamente as infecções urinárias, as sepses e as meningites de recém-nascidos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

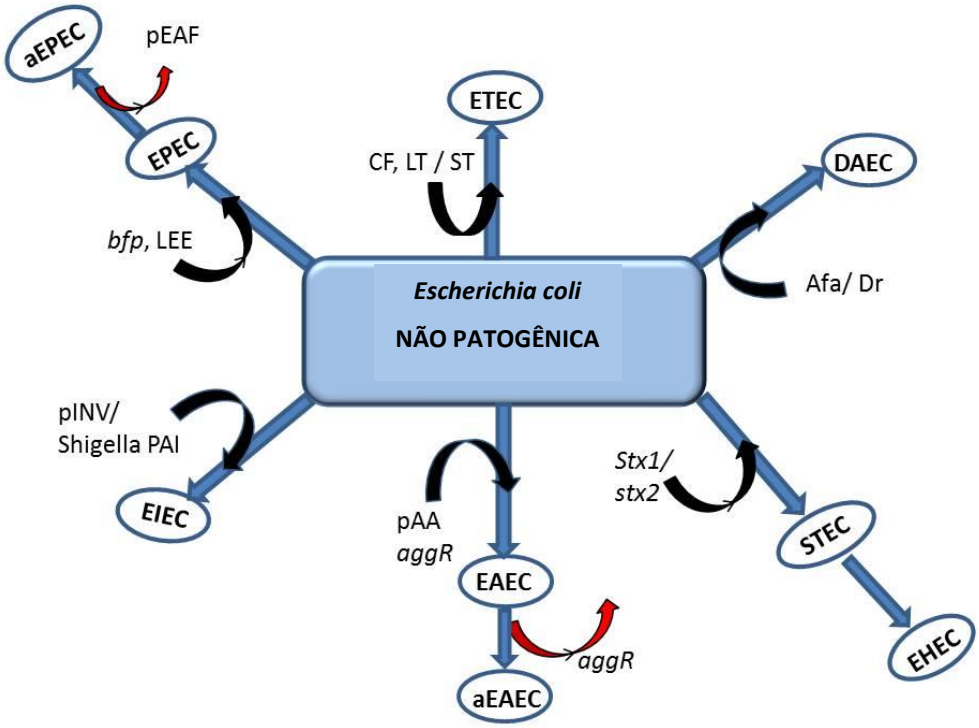
A espécie *E. coli* pertence à família Enterobacteriaceae, compreendendo bacilos Gram-negativos que compõe predominantemente a microbiota intestinal humana, desempenhando um importante papel na manutenção da fisiologia intestinal (NATARO; KAPER, 1998). De acordo com o esquema proposto por Kauffmann, os membros desta espécie podem ser diferenciados com base no antígeno somático (O), que corresponde à porção lipopolissacarídica da membrana externa (LPS), e no antígeno flagelar (H), podendo assim ser classificados em sorogrupos (O) e sorotipos (O:H) (KAUFFMANN, 1947).

Atualmente são identificados mais de 180 sorogrupos O em *E. coli*, que podem ser subclassificados em mais de 60 sorotipos O:H, possibilitando mais de 10.000 combinações. Porém, o número de sorotipos associados à diarreia é muito restrito (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

As cepas de *E. coli* causadoras de infecções intestinais são conhecidas como diarreiogênicas e estão agrupadas em seis categorias ou patótipos, considerando seus diferentes mecanismos de virulência, síndromes clínicas que causam, sorotipos e os tipos de interação com linhagens celulares (NATARO; KAPER, 1998). Esses patótipos são denominados: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998). As bactérias pertencentes a cada uma dessas categorias causam diarreia por mecanismos distintos, afetam diferentes grupos populacionais e expressam diferentes fatores de virulência (CLEMENTS et al., 2012; NATARO; KAPER, 1998).

A figura 1 apresenta um esquema da geração de cada um dos seis patótipos de *E. coli* diarreiogênicas, a partir de uma *E. coli* não patogênica que adquire os principais fatores de virulência característicos de cada patótipo. Dentro dos patótipos EPEC e EAEC, a perda de alguns desses fatores originam as cepas atípicas.

Figura 1 - Classificação das *E. coli* diarreiogênicas em patótipos determinados pela presença de fatores de virulência específicos.



As setas pretas indicam aquisição de fatores de virulência; as setas vermelhas indicam perda de fatores. CF, fatores de colonização; LT, toxina termolábil; ST, toxina termoestável; Afa/Dr, adesinas da família DR; Stx1/Stx2, toxinas Shiga tipo 1 e 2; pAA, plasmídeo de virulência de EAEC; *aggR*, codifica o ativador de genes de virulência de EAEC; pINV, plasmídeo de invasão de EIEC/*Shigella*; *Shigella* PAI, ilha de patogenicidade de *Shigella* spp.; *bfp*, operon que codifica a fímbria BFP; LEE, *locus of enterocyte effacement*; pEAF, plasmídeo *E. coli adhrence factor*. Fonte: Adaptado de Croxen et al. (2013).

ETEC é o patótipo capaz de produzir uma ou ambas enterotoxinas, denominadas termolábil (LT) e termoestável (ST). Esse patótipo pode aderir à mucosa intestinal através dos seus vários fatores de colonização (NATARO; KAPER, 1998). A colonização e a presença das enterotoxinas levam a uma diarreia aquosa tipicamente associada à infecção causada por ETEC, atingindo crianças e adultos. Além disso, é fortemente associada como agente de diarreia do viajante (ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA; TORRES, 2012).

As cepas de EIEC causam diarreia aquosa, colite inflamatória ou disenteria. São muito relacionadas à *Shigella* spp. em termos de características genéticas, bioquímicas e de patogenicidade (CROXEN et al., 2013). O mecanismo de patogênese das EIEC consiste da invasão da mucosa intestinal, seguida de fagocitose e lise do vacúolo endocítico,

multiplicação intracelular, movimentação no citoplasma e passagem para as células adjacentes (PARSOT, 2005).

STEC foi primeiramente identificada como agente de um surto de diarreia sanguinolenta e da síndrome hemolítica urêmica (SHU) nos EUA (RILEY et al., 1983). É classificada como um patógeno zoonótico que pode causar gastroenterite e colite hemorrágica, podendo ainda provocar a SHU, uma severa complicação renal e sistêmica devido à ação da toxina Shiga (Stx) em diversos órgãos (FRANKEL et al., 1998). As STEC possuem ainda uma subcategoria, denominada *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), sendo que a diferença entre elas dá-se pela capacidade das EHEC de causar a lesão *attaching and effacing* na mucosa intestinal, semelhante às EPEC (NATARO; KAPER, 1998).

DAEC foi assim denominada devido ao padrão de adesão difusa (AD) que as cepas deste patótipo apresentam em ensaios de interação em células epiteliais cultivadas, onde as bactérias aderem-se de forma difusa sobre toda a superfície celular (NATARO et al., 1987). A associação de DAEC com diarreia é controversa, uma vez que vários estudos epidemiológicos não associam esse patótipo à doença diarreica (GIRÓN et al., 1991; GOMES et al., 1998; RODRIGUES et al., 2002; SCALETSKY et al., 2002a).

1.2 *E. coli* enteroagregativa

O termo *E. coli* enteroaderente agregativa foi estabelecido por Nataro et al. (1987) ao classificar algumas cepas de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda em crianças no Chile. Essas cepas apresentavam um tipo de interação distinto com células HEp-2, designado como adesão agregativa (AA). No padrão AA as bactérias aderem-se umas as outras, à superfície das células HEp-2 e também à superfície da lamínula na ausência de células, numa configuração que lembra tijolos empilhados, formando agregados heterogêneos (NATARO et al., 1987). Posteriormente o patótipo passou a ser chamado *E. coli* enteroagregativa ou EAEC (BAUDRY et al., 1990).

De modo semelhante ao que ocorreu com as EPEC, Sarantuya et al. (2004) propuseram a classificação de cepas de EAEC nos grupos típica e atípica. Enquanto as EPEC são classificadas nesses dois grupos levando-se em conta a presença ou ausência do plasmídeo pEAF (KAPER, 1996), no patótipo EAEC essa classificação se baseia na presença ou não do gene *aggR*, o qual codifica uma proteína reguladora global dos genes de virulência

de EAEC e está localizado no seu plasmídeo de virulência (HARRINGTON et al., 2006; NATARO et al., 1994).

Desde a sua primeira descrição, EAEC está associada com casos de diarreia nos mais variados cenários ao redor do mundo. Estes estudos incluem a diarreia endêmica em crianças, tanto em países industrializados quanto em desenvolvidos (HUANG; DuPONT, 2004; HUANG et al., 2004; OKEKE; NATARO, 2001), a diarreia persistente (>14 dias) entre indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida e crianças desnutridas, especialmente em países em desenvolvimento (GASSAMA-SOW et al., 2004; HUANG et al., 2006; MATHEWSON et al., 1998), e como causa da diarreia do viajante (ADACHI et al., 2001; GÁSCON et al., 1998; OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

EAEC tem sido reconhecida cada vez mais como agente de diarreia aguda e persistente em países desenvolvidos e em desenvolvimento e é considerado um enteropatógeno emergente (BHAN et al., 1989; CRAVIOTO et al., 1991; FANG et al., 1995; HARRINGTON et al., 2006; KAPER et al., 2004). Além disso, surtos de diarreia causados por EAEC associados ao consumo de alimentos contaminados foram relatados em países desenvolvidos, como Reino Unido (SMITH et al., 1994; SMITH et al., 1997), Japão (HARADA et al., 2007; ITOH et al., 1997; YATSUYANAGI et al., 2002) e Itália (SCAVIA et al., 2008). Em um dos surtos no Japão foram acometidas 2.697 crianças em idade escolar (ITOH et al., 1997).

Mais recentemente, um surto de diarreia de grandes proporções atingiu vários países da Europa, principalmente a Alemanha. Foram afetados 4.321 indivíduos, sendo que 900 destes desenvolveram a SHU, ocasionando mais de 50 mortes. A cepa responsável por este grave surto foi um híbrido de EAEC e EHEC, uma *E. coli* O104:H4 que carregava fatores de virulência encontrados em EAEC típica, além do gene que codifica a toxina Stx de STEC (BIELASZEWSKA et al., 2011; GRAD et al., 2012). Outros relatos de casos de EAEC que adquiriram o gene *stx*, já haviam sido reportados no Japão (IYODA et al., 2000), França (MORABITO et al., 1998), Irlanda do Norte (DALLMAN et al., 2012) e República Centro-Africana (MOSSORO et al., 2002). Recentemente Clements et al. (2012) propuseram a classificação dessas cepas em um novo patótipo denominado STEAEC.

A patogenicidade de EAEC tem sido atribuída a fatores particulares que não estão uniformemente distribuídos entre as cepas de EAEC isoladas ao redor do mundo (GIOPPO et al., 2000; JENKINS et al., 2006; NATARO; KAPER, 1998; OKEKE et al., 2000; SPENCER

et al., 1999; SARANTUYA et al., 2004; UBER et al., 2006). Não foi encontrado até o presente momento um marcador de virulência comum a todos isolados de EAEC (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, et al., 2012).

A patogênese de EAEC ainda não é bem definida, porém diversos estudos sobre o assunto sugerem um modelo de três estágios para a sua patogênese: (1) adesão inicial à mucosa intestinal e à monocamada de muco (HICKS et al., 1996; TZIPORI et al., 1992); (2) indução de produção de muco, seguido de formação de biofilme sobre a superfície da mucosa (HICKS et al., 1996) e (3) desencadeamento de um processo inflamatório com liberação de citocinas, o qual resulta em danos à mucosa e secreção intestinal (BOUCKENOOGHE et al., 2000; GREWAL et al., 1997; HARRINGTON et al., 2005; JIANG et al., 2002; STEINER et al., 1998). O hospedeiro que sofre de subnutrição pode ser incapaz de reparar os danos e tende a desenvolver a síndrome da diarreia persistente.

O ensaio de adesão às células epiteliais HEp-2 ou HeLa constitui-se no teste de referência para detecção da categoria EAEC, evidenciando o padrão AA característico (NATARO; KAPER, 1998). Como alternativa ao teste de adesão, Baudry et al. (1990) desenvolveram uma sonda genética que consiste de um fragmento críptico de 1 kb do plasmídeo presente em uma cepa de EAEC pertencente ao sorotipo O3:H2 (cepa 17-2). Esse fragmento, descrito inicialmente como sonda CVD432 e, posteriormente, como sonda AA ou sonda EAEC, tem sido amplamente usado na detecção de EAEC, embora sua especificidade e sensibilidade variem de acordo com o grupo de cepas em estudo, confirmando a heterogeneidade dentro do patótipo (BAUDRY et al., 1990; DEBROY et al., 1994; FANG et al., 1995; GOMES et al., 1998). Posteriormente, Nishi et al. (2003) evidenciaram que o fragmento sonda CVD432 na verdade corresponde ao gene *aatA*, o qual faz parte de um cluster de cinco genes (*aatPABCD*) que codificam as proteínas do sistema do tipo ABC de secreção. Desta forma, a sonda CVD432 passou a ser corretamente denominada de *aatA*.

Além da expressão de adesinas e toxinas, vários outros fatores de virulência têm sido caracterizados em EAEC, codificados por genes localizados tanto em plasmídeos quanto no cromossomo de cepas consideradas protótipo (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012).

Grande parte dos potenciais fatores de virulência conhecidos em EAEC foi caracterizada na cepa protótipo 042. Essa cepa pertencente ao sorotipo O44:H18, foi isolada de um caso de diarreia no Peru e foi capaz de causar diarreia em voluntários humanos

(NATARO et al., 1985; NATARO et al., 1995). Nessa cepa, a maioria dos genes que codificam esses fatores estão localizados no plasmídeo de virulência associado à adesão agregativa denominado pAA2 (CZECZULIN et al., 1999).

Um grupo de proteínas denominadas autotransportadores pertencentes à família serino proteases, mais conhecidas como SPATES (*serine protease autotransporters of* Enterobacteriaceae) participam da patogênese de EAEC. Essas proteínas possuem um domínio C-terminal conservado que forma um poro na membrana externa da bactéria, por onde a proteína madura é transportada (HENDERSON et al., 1998). A cepa protótipo 042 apresenta em seu genoma, os genes *pet* e *pic*, que codificam dois membros das SPATE.

Pet (*plasmid encoded toxin*) foi inicialmente descrita como uma toxina capaz de causar acúmulo de fluído e lesões necróticas e hemorrágicas em alça ligada de rato (ESLAVA et al., 1998). Além dessas atividades enterotóxicas, Pet tem atividade de citotóxica clivando a α fodrina, leva à disrupção do citoesqueleto e causando o destacamento e morte de células epiteliais.

Pic (*protein involved in intestinal colonization*) apresenta atividade mucinolítica, de hemaglutinação e confere à bactéria a capacidade de resistir à atividade bactericida do soro (HENDERSON et al., 1999). Diferentemente de *pet*, localizado no pAA2 da cepa EAEC 042, o gene *pic* está localizado em seu cromossomo e a sua presença também foi detectada em *Shigella flexneri* 2a (HENDERSON et al., 1999). Localizado na fita antissenso ao gene *pic*, estão os genes *setBA*, os quais codificam a enterotoxina ShET-1 (*Shigella enterotoxin 1*), que promove acúmulo de fluido em alça ligada de coelho (FASANO et al., 1995).

Além dos genes *pic* e *setBA* no cromossomo da cepa 042, foi localizado o gene *irp-2* que codifica a proteína *iron-repressible high-molecular weight protein* 2, envolvida na biossíntese de um sideróforo em *Yersinia enterocolitica* (SCHUBERT et al., 1998).

O sequenciamento do genoma da cepa protótipo 042 revelou que o locus *pic*/*setBA* está inserido em uma ilha de patogenicidade (PAI) de 117 kb inserida no locus do RNA transportador *pheU*. Essa PAI contém um grupo de genes regulados por AggR, os quais foram denominados *aai* (*AggR-activated island*) (DUDLEY et al., 2006b). Esse operon codifica genes envolvidos na secreção de pelo menos uma proteína e parece fazer parte de um aparato de secreção do tipo VI. A contribuição dos produtos dos genes *aaiA* para a patogênese de EAEC é desconhecida, porém aparentemente não têm função na aderência a superfícies ou a células do epitélio intestinal (DUDLEY et al., 2006b).

Czeczulin et al. (1999) identificaram diversos genes na cepa protótipo 042 associados à virulência de EAEC. Entre eles os genes plasmideais *astA, aap, shf, rfbU* e *virK*.

Adjacente ao gene *pet* localiza-se o gene *astA*, que codifica a enterotoxina termoestável EAST-1 (*E. coli heat-stable enterotoxin 1*). Essa enterotoxina é capaz de induzir um aumento da concentração de cGMP intracelular de forma semelhante à toxina ST de ETEC (SAVARINO et al., 1993). O papel de EAST-1 na patogênese de EAEC é controverso, uma vez que a sua presença também foi detectada em cepas de *E. coli* não patogênicas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SAVARINO et al., 1996).

O gene *aap* (*anti-aggregation protein*) codifica a proteína dispersina, relacionada à dispersão bacteriana na mucosa intestinal (SHEIKH et al., 2002; VELARDE et al., 2007). A translocação da dispersina através da membrana externa está relacionada ao sistema de transporte do tipo ABC do qual o gene *aatA* faz parte (NISHI et al., 2003).

O sequenciamento do plasmídeo pAA2 da cepa 042 revelou ainda os genes *shf, rfbU* e *virK* (CZECZULIN et al.,1999), o qual apresentou alta similaridade com o mesmo grupo localizado no plasmídeo de virulência de *Shigella flexneri* (FUJIYAMA et al., 2008). Esse grupo de genes foi denominado *cap cluster*, devido a antiga nomenclatura *capU* para o gene *rfbU* (CZECZULIN et al.,1999; RAJAKUMAR et al., 1996). O gene plasmideal *shf*, assim denominado por apresentar homologia com dois genes descritos em *Shigella flexneri* 2a (*shf1* e *shf2*), codifica uma proteína homóloga a IcaB de *Staphylococcus epidermidis*, relacionada à formação de biofilme nessa espécie (CZECZULIN et al., 1999). O gene *rfbU* codifica uma proteína que apresenta 50% de identidade com uma proteína relacionada à biossíntese de lipopolissacarídeo de *E. coli* O157:H7 (CZECZULIN et al., 1999). O gene *virK* foi sugerido como sendo um regulador pós-transcricional de *virG*, ambos localizados no plasmídeo de virulência de *Shigella flexneri* (NAKATA et al., 1992).

Adesinas não fimbriais ou proteínas de membrana externa associadas ao padrão AA, têm sido evidenciadas em diversas cepas de EAEC pertencentes a distintos sorotipos (CHART et al., 1995; DEBROY et al., 1995; MONTEIRO-NETO et al., 1998, 2003; WAI et al., 1996). Debroy et al. (1995) e Wai et al. (1996) relataram a presença de proteínas de membrana externa de 30 e 38 kDa, respectivamente, relacionadas ao fenótipo AA em cepas de EAEC. A proteína de membrana externa de 58 kDa (*Aggregative protein 58*) ou Ap58, com propriedades hemaglutinantes descrita em cepas de EAEC do sorogrupo O111:H12, possui participação na adesão agregativa (MONTEIRO-NETO et al., 2003).

Técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e de hemaglutinação evidenciaram estruturas fimbriais em cepas de EAEC (KNUTTON et al., 1992; SUZART et al., 2001; VIAL et al., 1988). Entretanto, apenas as estruturas denominadas *aggregative adherence fimbria* (AAF) foram caracterizadas geneticamente (BERNIER et al., 2002; BOISEN et al., 2008; CZECZULIN et al., 1997; ELIAS et al., 1999; NATARO et al., 1992).

As AAFs são codificadas em plasmídeos de alta massa molecular, denominados pAA. Até o momento, são conhecidos cinco tipos de AAF, nomeados de I a V (BERNIER et al., 2002; BOISEN et al., 2008; CZECZULIN et al., 1997; DALLMAN et al., 2012; NATARO et al., 1992).

Vial et al. (1988) demonstraram que na cepa protótipo 17-2 a capacidade de aderir de forma agregativa estava associada à presença do plasmídeo pAA1 de aproximadamente 60 MDa. Em seguida, Nataro et al. (1992) relataram a existência de uma fímbria disposta em feixes, com diâmetro de 2-3 nm presente nesta cepa, a qual foi denominada de AAF/I. Os genes necessários para a expressão de AAF/I estão contidos no pAA1, formando duas regiões distintas separadas por um segmento de 9 kb (NATARO et al., 1993). A região 1 contém o cluster de quatro genes *aggDCBA*, os quais codificam a pilina (*aggA*), o *usher* (*aggC*), a chaperona (*aggD*) e uma proteína críptica (*aggB*). AggA é a subunidade estrutural da fímbria AAF/I e correspondente a uma proteína de 14 kDa (SAVARINO et al., 1994). A região 2 apresenta um regulador homólogo à classe de proteínas reguladoras da transcrição da família AraC, denominado AggR, ativador transcricional necessário para a expressão dessa fímbria (NATARO et al., 1994).

A fímbria AAF/II foi descrita na cepa protótipo 042 e é genética e morfologicamente distinta de AAF/I. Apresenta estrutura em forma de feixes semirrígidos e medeia o padrão AA em células epiteliais. Em semelhança ao operon de AAF/I, os genes que codificam AAF/II estão localizados em um plasmídeo (pAA2) de 65 MDa e estão organizados em duas regiões não contiguas, separadas por um fragmento de 12 kb (CZECZULIN et al.,1997). Na região 1 estão os genes que codificam a chaperona AafD, a pilina AafA, e o ativador transcricional AggR e na região 2 estão os genes que codificam o *usher* AafC e a proteína críptica AafB (ELIAS et al., 1999).

A terceira fímbria AAF foi identificada na cepa de EAEC 55989 por Bernier et al. (2002). AAF/III também está envolvida com a agregação das bactérias e sua adesão agregativa a células epiteliais. A sua biogênese é codificada pelo operon *agg-3*, o qual é

bastante semelhante ao operon das adesinas Afa de *E. coli* uropatogênica (UPEC) (SERVIN, 2005). Diferentemente de AAF/I e II, as quais formam feixes frouxos, AAF/III aparece em filamentos individuais longos e flexíveis. A organização do cluster AAF/III é muito similar à organização da AAF/I, constituído pelos genes *agg-3A, agg-3B, agg-3C, agg-3D*. Em uma região localizada 5 kb à jusante do gene *agg-3A*, se localiza um gene que possui homologia com *aggR* (BERNIER et al., 2002).

As sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências de nucleotídeos dos genes envolvidos com a biogênese de AAF/I e AAF/II, apresentam similaridade com as proteínas relacionadas à biogênese das adesinas Afa/Dr por possuírem regiões conservadas nos genes que codificam a proteína de membrana externa (*usher*) e a proteína periplasmática (chaperona) (NATARO et al., 1998). A família Dr de adesinas é composta por adesinas seguindo a arquitetura: chaperona, proteína *usher*, subunidade acessória e subunidade principal. São expressas por *E. coli* e relacionadas com infecções do trato intestinal e trato urinário que apresentam como receptor comum o antígeno eritrocitário do grupo sanguíneo Dr, presente na molécula *decay-accelerating factor* (NOWICKI et al., 1990; SERVIN, 2005).

Recentemente a adesina Hda foi associada ao fenótipo AA produzido pela cepa de EAEC C1010-00, isolada de um caso de diarreia na Dinamarca (BOISEN et al., 2008). A biogênese dessa adesina também é codificada por quatro genes que formam o operon *hdaDCBA*. Sua sequência revelou homologia com a adesina afimbrial M-aglutinina, produzida por cepas de UPEC, e também com a adesina Afa-8 de DAEC. Embora na cepa C1010-00 a adesina seja codificada por um operon de configuração genética semelhante a Afa-Dr, análises de sequência mostraram que HdaA pertence a um grupo filogenético diferente do grupo formado pelas adesinas AAF. Considerando o fenótipo AA o qual a cepa confere, juntamente com a presença de fatores de virulência de EAEC, como *aatA*, *aap* e *aggR*, que esta associado a regulação dos genes que codificam as adesinas AAF em EAEC, foi proposta a designação AAF/IV para o novo tipo de adesina relacionado ao padrão AA.

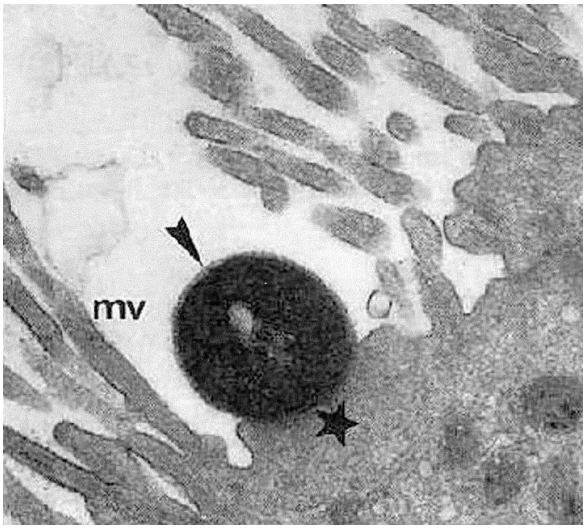
Uma cepa de *E. coli* do sorotipo O111:21 foi isolada de uma criança internada com SHU na Inglaterra, essa cepa foi caracterizada como um híbrido de EAEC/STEC e, assim como no surto da Alemanha em 2011 (BIELASZEWSKA et al., 2011), a cepa apresentava o plasmídeo pAA de EAEC além do gene *stx*, que codifica a toxina Stx. Após análise de sequenciamento do genoma dessa cepa, Dallman et al. (2012) identificaram os genes que

codificam uma nova fimbria agregativa diferente das descritas até o momento, classificando-a como AAF/V (DALLMAN et al., 2012; PRAGER et al., 2014).

1.3 *E. coli* enteropatogênica

EPEC tem sido identificada como um dos principais agentes da diarreia aguda na infância em países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998). Esse patótipo tem a capacidade de causar uma lesão histopatológica no epitélio intestinal, bem como em cultura celular, denominada lesão *attaching and effacing* (A/E), além de não secretar a toxina Stx, atributo de STEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). A lesão A/E, apresentada na figura 2, é caracterizada pela desestruturação das microvilosidades intestinais, aderência íntima da bactéria à membrana apical da célula epitelial, rearranjo do citoesqueleto e formação de estruturas celulares semelhantes a pedestais, formadas pelo acúmulo de actina polimerizada, onde a bactéria permanece aderida (MOON et al., 1983).

Figura 2 – Lesão *attaching and effacing* em uma cepa de EPEC.



Fotomicrografia de uma lesão *attaching and effacing* em biópsia duodenal humana demonstrando a desestruturação das microvilosidades (mv), polimerização da actina com formação do pedestal (indicada por uma estrela) e adesão de uma EPEC (indicada por uma seta). Fonte: Pedroso et al. (1993).

Os genes responsáveis por esse processo encontram-se em uma ilha de patogenicidade cromossômica denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE) (CLARKE

et al., 2003; DONNENBERG et al., 1997; ELLIOT et al., 1998; McDANIEL et al., 1995). Dentre eles estão o gene *eae*, que codifica a adesina intimina; os genes *esc*, codificadores do sistema de secreção do tipo III; os genes *esp*, que codificam as proteínas secretadas Esp (*E. coli secreted proteins*); e o gene *tir*, o qual codifica o receptor da intimina denominado *translocated intimin receptor* (Tir) (FRANKEL et al., 1998; KAPER et al., 2004; TAYLOR et al., 1999). Os genes que fazem parte de LEE estão organizados em cinco operons principais: LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5 (MELLIES et al., 1999).

Além das proteínas codificadas por LEE, outros fatores complementares, mas não essenciais, participam da patogênese de EPEC. Esses fatores estão albergados em um plasmídeo denominado pEAF (*E. coli adherence factor*). Nesse plasmídeo encontra-se o operon *bfp*, que codifica a fímbria *bundle forming pilus* (BFP), uma fímbria do tipo IV, organizada em forma de feixes (GIRÓN et al., 1993); o operon *per* (*plasmid encoded regulator*), o qual codifica um complexo regulador dos genes de virulência de EPEC (TOBE *et al*, 1999); além de uma sequência críptica chamada fragmento sonda EAF, muito utilizada como marcador para o diagnóstico molecular de EPEC.

A lesão A/E pode ser visualizada através de microscopia eletrônica de transmissão, ou pelo ensaio conhecido como teste de FAS (*fluorescent-actin staining*), onde a actina polimerizada acumulada no pedestal é evidenciada através da ligação à faloidina marcada a um fluorocromo e visualizada em microscopia de fluorescência (KNUTTON et al., 1989).

Todo processo que leva à formação da lesão A/E pode ser divido em quatro fases (CLARKE et al., 2003). Primeiramente as interações com a célula hospedeira são mediadas pela fímbria BFP, filamentos EspA e flagelo. No segundo estágio, ocorre a desestruturação das microvilosidades e moléculas efetoras, cujos genes estão presentes em LEE e também fora da ilha de patogenicidade, são secretadas para o interior da célula hospedeira através do sistema de secreção do tipo III. No terceiro estágio ocorre uma adesão íntima da bactéria ao enterócito, mediada pela interação intimina-Tir, provocando acúmulo de actina polimerizada e outros componentes do citoesqueleto neste local da adesão. Finalmente, estas alterações no citoesqueleto vão levar à formação de uma estrutura semelhante a um pedestal, no qual a EPEC permanece aderida. Estas alterações na mucosa intestinal levam ao desequilíbrio eletrolítico que culmina na diarreia (CROXEN; FINLAY, 2010).

Com o avanço em termos de caracterização genética de cepas de EPEC, a literatura específica passou a apontar uma diversidade nessas cepas. Por esse motivo, durante o 2º

Simpósio Internacional sobre EPEC foi definida uma nova classificação que dividia as EPEC em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC). Essa subclassificação permitiu diferenciar cepas de tEPEC pela presença do plasmídeo pEAF, mencionado anteriormente, enquanto as aEPEC não apresentam esse plasmídeo (KAPER, 1996).

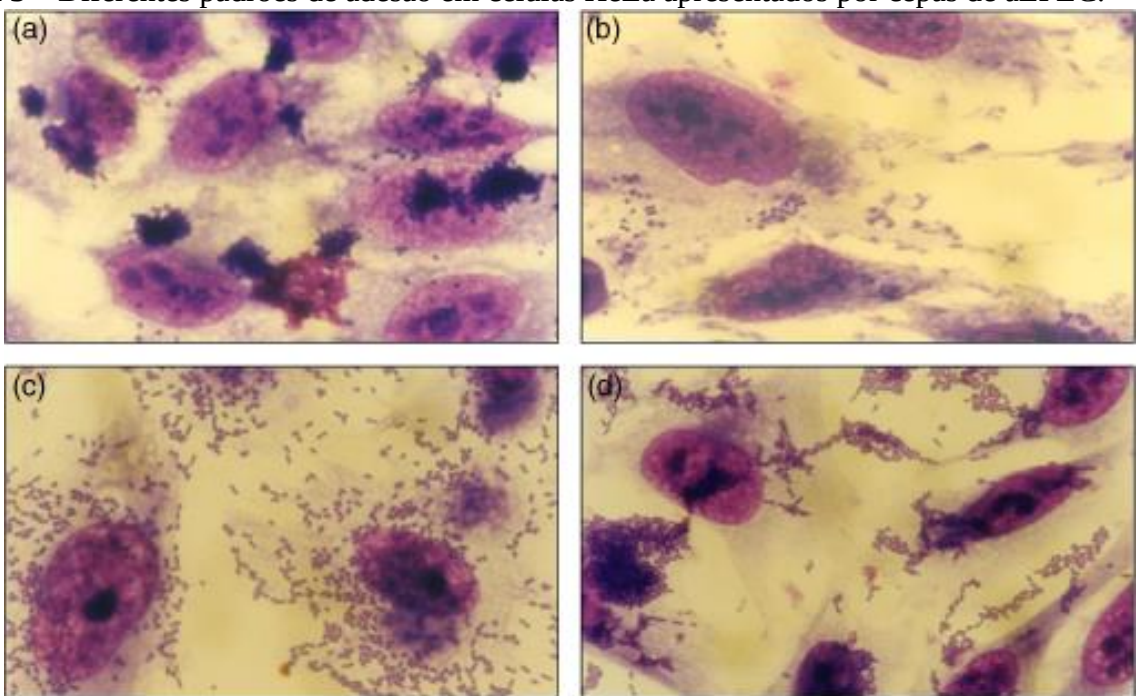
Como aEPEC não carrega o pEAF e, portanto, não expressa a fímbria BFP, a interação com as células hospedeiras e a formação da lesão A/E é tardia em comparação com tEPEC (BUERIS, 2008), sendo inicialmente mediada por EspA, seguida pela interação intimina-Tir quando a adesão se torna íntima (HERNANDES et al., 2009). A participação de outras adesinas encontradas em aEPEC, bem como do flagelo, não podem ser descartadas nessa etapa da patogênese (GIRÓN et al., 2002; SAMPAIO et al., 2009).

Durante décadas, os diversos estudos epidemiológicos sobre a diarreia infecciosa apontaram as tEPEC como o enteropatógeno mais prevalente em nosso meio, embora fosse rara nos países desenvolvidos (GOMES et al., 1989; GOMES et al., 1991; NATARO, KAPER, 1998). Nos últimos anos, com a introdução da subdivisão de EPEC em típicas e atípicas, houve uma frequente observação do predomínio da incidência de aEPEC no Brasil, e um declínio na incidência de tEPEC (HERNANDES et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Diversos estudos epidemiológicos recentes confirmam esse dado, demonstrando que as aEPEC configuram um grupo de patógenos emergentes (ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; HERNANDES et al., 2009; SCALETSKY et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). As aEPEC estão atualmente entre os principais agentes de diarreia em nosso meio e em outros países (FRANZOLIN et al., 2005; HERNANDES et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Por exemplo, 92% de isolados de EPEC coletados de crianças no Brasil entre os anos de 2001 a 2002 foram classificados como aEPEC, comparados com 38% entre os anos de 1998-1999 em outro estudo (FRANZOLIN et al., 2005; SCALETSKY et al., 2010). Cepas isoladas de crianças com diarreia no Iran apresentaram prevalência de 39,3% de tEPEC, contra 61,7% de aEPEC (BAKHSHI et al., 2013). Entretanto, ainda existem relatos de países onde a prevalência de tEPEC é superior a das aEPEC (ALIKHANI; MIRSALEHIAN; ASLANI, 2006; KOTLOFF et al., 2013).

As tEPEC aderem à superfície de células epiteliais formando grupos compactos de bactérias na superfície celular, o que caracteriza o padrão denominado adesão localizada, ou AL (SCALETSKY et al., 1984). A fímbria BFP é responsável pela formação da microcolônia

bacteriana compacta, promovendo e estabilizando a interconexão entre as bactérias (GIRÓN et al., 1993). Por outro lado, as aEPEC podem aderir ou não a células epiteliais em cultura. As aderentes expressam frequentemente o padrão de adesão localizada-*like* (AL-L), formando grupos menos compactos que no padrão AL após períodos prolongados de interação, geralmente 6 horas (ABE et al., 2009; RODRIGUES et al., 1996; VIEIRA et al., 2001). Algumas cepas de aEPEC podem expressar os padrões AA ou AD (HERNANDES et al., 2009). O padrão AA é caracterizado por bactérias aderentes de forma semelhante a tijolos empilhados, formando agregados na lamínula e na superfície da célula epitelial (NATARO et al., 1987), enquanto no padrão AD, as bactérias aderem difusamente por toda a superfície celular (SCALETSKY et al., 1984).

Figura 3 – Diferentes padrões de adesão em células HeLa apresentados por cepas de aEPEC.



(a) adesão localizada (AL), (b) adesão localizada-*like* (AL-L), (c) adesão difusa (AD) e (d) adesão agregativa(AA). Fonte: Hernandes et al. (2009).

A princípio os padrões AA e AD definem os patótipos EAEC e DAEC, respectivamente (NATARO; KAPER, 1998). Entretanto, cepas de *E. coli* diarreiogênicas pertencentes a outros patótipos podem expressar esses padrões, tais como ETEC, EHEC e aEPEC (DOS SANTOS et al., 2007; HERNANDES et al., 2009; SILVA et al., 1996; VIEIRA et al., 2001). Desta forma, o padrão de adesão de uma *E. coli* diarreiogênica deve ser avaliado

em conjunto com determinantes de virulência para a definição do patótipo a que essa cepa pertence.

Uma vez que as aEPEC são desprovidas da fímbria BFP a adesão aos enterócitos é resultante da interação dos filamentos EspA e do complexo intimina-Tir (CROXEN et al., 2013), além do flagelo nas amostras móveis (SAMPAIO et al., 2009). A presença de outras adesinas não codificadas em LEE auxilia essa interação e, consequente, a colonização da mucosa intestinal.

Lda é a única adesina descrita originalmente a partir de uma cepa de aEPEC até presente momento (SCALETSKY et al., 2005). A adesina Lda foi identificada em uma aEPEC do sorotipo O26:H11, é codificada pelo cluster de genes que compõem o *locus for diffuse adherence* (*lda*), apresenta estrutura não fimbrial e está envolvida na adesão de cepa onde foi detectada (SCALETSKY et al., 2005). O gene *ldaH*, que codifica uma das subunidade estruturais da adesina, foi detectado em outros sorotipos de aEPEC além do O26:H11 (SCALETSKY et al., 2005; SCALETSKY et al., 2009).

Estudos de caracterização de aEPEC detectaram genes que codificam várias adesinas originalmente descritas em outros patótipos de *E. coli* (AFSET et al., 2006; FREITAS, 2012; GOMES et al., 2004; HERNANDES et al., 2011; SCALETSKY et al., 2010; TENNANT et al., 2009).

Essas adesinas assessórias detectadas em aEPEC incluem algumas originalmente descritas em STEC/EHEC: Lpf – *long polar fimbriae* (TORRES et al., 2002), Paa – *porcine A/E-lesion associated protein* (BATISSON et al., 2003), Iha – IrgA-*homologue adhesin* (Tarr et al., 2000), ToxB – codificado por *toxB* localizado no plasmídeo pO157 de EHEC (TATSUNO et al., 2001), Efa1 – *EHEC factor for adhesion 1* (NICHOLLS et al., 2000); em UPEC/DAEC: Afa – *afimbrial adhesin* (SERVIN, 2005), fímbria P (LANE; MOBLEY, 2007) e fímbria tipo I (CONNELL et al., 1996); e em EAEC: pili do tipo IV ou Pil (DUDLEY et al., 2006a). Além daquelas presentes de forma ubiquitária em *E. coli*: fímbria tipo I, ECP - *E. coli common pilus* (RENDÓN et al., 2007), fímbria tipo *curli* (COLLINSON et al., 1993), HCP - *hemorrhagic coli pili* (XICOHTENCATL-CORTES et al., 2007); e ELF - *E. coli laminin-binding fimbriae* (SAMADDER et al., 2009).

Com exceção de Lda, o papel de todas essas adesinas na adesão de aEPEC não foi estabelecido, uma vez que a maioria desses estudos só determinou a presença dos seus genes.

1.4 *E. coli* sorotipo O142:H34

A sorotipagem de cepas de *E. coli* é extremamente útil em estudos epidemiológicos. Devido à associação epidemiológica de certos sorogrupos de *E. coli* com diarreia, em 1987 a OMS definiu EPEC como pertencente a um dos seguintes sorogrupos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (WHO, 1987). Esses sorogrupos também são conhecidos como sorogrupos clássicos de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Porém, estudos posteriores evidenciaram que os sorogrupos clássicos de EPEC incluem sorotipos constituídos por cepas pertencentes a outros patótipos, como EAEC, ETEC e STEC/EHEC, e que alguns desses sorotipos correspondem a clones específicos (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

Os sorotipos de aEPEC podem ou não pertencer aos sorogrupos O de EPEC, além disso, muitas cepas não apresentam antígenos O e H tipáveis. Mais ainda, sorotipos desta categoria têm se mostrado bastante heterogêneos quanto aos fatores de virulência, podendo apresentar adesinas e várias proteínas secretadas de outros patótipos (CAMPOS et al., 1994; RODRIGUES et al., 1996; VALLE et al., 1997).

Tabela 1- Sorotipos frequentemente detectados em cepas de EPEC típicas e atípicas.

EPEC	Sorotipos
Típicas	O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6. O142:H6, O142:H34
Atípicas	O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2

FONTE: Trabulsi; Keller; Gomes (2002).

Vários estudos relataram o achado do sorogrupo O142 como agente de diarreia aguda (BLANCO et al., 2006; BUGAREL et al., 2011; CRAVIOTO et al.,1996; DULGUER et al., 2003; FRANZOLIN et al., 2005; GHILARDI et al., 2003; GIRÃO et al., 2006; GOMES et al., 1989; IRINO et al., 1984; SCALETSKY et al., 2009; SCOTLAND et al., 1996)

Estudos relataram o aparecimento do sorogrupo O142 em nosso meio, como causa de diarreia, a partir de 1984 (IRINO et al., 1984). Os principais sorotipos isolados desde então são o O142:H34 (BUGAREL et al., 2011; FRANZOLIN et al., 2005; GHILARDI et al., 2003; IRINO et al., 1984) e o O142:H6 (BUGAREL et al., 2011; CRAVIOTO et al.,1996; GHILARDI et al., 2003; GIRÃO et al., 2006; GOMES et al., 1989; IRINO et al., 1984; ROSA et al., 1998; SCOTLAND et al., 1996). Geralmente as cepas desses sorotipos são classificadas como tEPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Ghilardi et al. (2003) avaliaram os diversos sorotipos que compunham o sorogrupo O142 de cepas de *E. coli* de origem fecal isoladas entre 1977 e 1991 no Estado de São Paulo, detectando os sorotipos O142:H34 (57,5%), O142:H6 (27%) e O142:H2 (11,5%).

Através da pesquisa da presença de marcadores de virulência dos patótipos de *E. coli* diarreiogênica, bem como a determinação dos padrões de adesão em células HeLa, foi possível mostrar que a maioria das cepas O142 eram tEPEC (*eae*, *bfp*, EAF), mas algumas foram classificadas como aEPEC (*eae*) (GHILARDI et al., 2003). Esse perfil foi mantido dentro do sorotipo O142:H34, o mais frequente na amostragem.

De forma inusitada uma cepa do sorotipo O142:H34 (Ec46/88) apresentou características genotípicas e fenotípicas híbridas de EPEC e EAEC, ou seja, a presença do gene *eae*, o qual codifica a adesina intimina de EPEC; a ausência do plasmídeo pEAF, que caracteriza EPEC típica; a reatividade com o fragmento sonda CVD432 (*aatA*), indicativo da presença do plasmídeo de virulência de EAEC; e a expressão do padrão AA que caracteriza o patótipo EAEC. Além disso, essa cepa não albergava os genes estruturais das fímbrias de EAEC descritas até aquele momento (GHILARDI et al., 2003).

Conforme mencionado anteriormente, o padrão AA já foi evidenciado em vários sorotipos de aEPEC, mas em nenhum caso houve a reatividade dessas cepas com a sonda *aatA* usada no diagnóstico de EAEC (ABE et al., 2009; DULGUER et al., 2003; ROBINS-BROWNE et al., 2004; VIEIRA et al., 2001).

É complexa a classificação como EPEC ou EAEC de uma cepa apresentando essa combinação genotípica e fenotípica. A produção do padrão AA e a reatividade com a sonda *aatA* sugerem que essa amostra seja uma aEPEC que adquiriu um plasmídeo de virulência de EAEC. Entretanto, a possibilidade de que ela seja uma EAEC que recebeu a região LEE de EPEC não pode ser descartada. Os genes de virulência que codificam essas características

estão localizados em elementos móveis, sendo susceptíveis à transferência horizontal (McDANIEL et al., 1995; NATARO et al., 1993).

As fimbrias apresentam importante papel na interação bacteriana às superfícies bióticas e abióticas, além de outras funções (TORRES; ZHOU; KAPER, 2005). Uma vez que isolados de aEPEC não expressam a fimbria BFP, a qual tem um importante papel na adesão de tEPEC, a caracterização de outras adesinas fimbriais são importantes para o conhecimento dos mecanismos de patogenicidade de aEPEC, especificamente a colonização.

Poucos estudos na literatura caracterizaram adesinas de aEPEC não codificadas em LEE avaliando o papel na adesão *in vitro* (HERNANDES et al., 2011; SCALETSKY et al., 2005). As aEPEC apresentam um padrão de adesão totalmente heterogêneo, e o padrão AA pode ser mediado por essa enorme variedade de adesinas. Tendo em vista a importância epidemiológica do sorotipo O142:H34 e a inusitada combinação de genes de virulência da cepa Ec46/88, a caracterização de marcadores de virulência adicionais nessa amostra pode contribuir para o entendimento de seus mecanismos de virulência e sua correta classificação como aEPEC ou EAEC.

2 OBJETIVOS

Avaliar o papel de estruturas fimbriais no estabelecimento do padrão de adesão agregativa da cepa Ec46/88 de *E. coli* do sorotipo O142:H34, bem como a sua classificação como EPEC ou EAEC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

A cepa selecionada para este estudo, *E. coli* Ec46/88, pertence ao sorotipo O142:H34 e apresenta o seguinte genótipo: *eae*$^{+}$/EAF^{-}/*bfp*$^{-}$/*stx*$^{-}$. Essa cepa foi isolada de um caso de diarreia aguda na cidade de São Paulo e previamente caracterizada como reativa com a sonda CVD432 (*aatA*), empregada no diagnóstico de EAEC, e expressando o padrão de adesão AA (GHILARDI et al., 2003).

As cepas protótipo de EAEC 17-2 (O3:H2) e O42 (O44:H18); de EPEC típica E2348/69 (O126:H7); e de EHEC C1520-77 (O157:H7), foram empregadas como controles positivos nas PCR para detecção dos fatores de virulência de EPEC, EHEC e EAEC, nos testes de adesão em células epiteliais, de agregação de actina, análises plasmideais e *Southern blot* (LEVINE et al., 1978; MAIRENA et al., 2004; NATARO et al., 1985; VIAL et al., 1988). A *E. coli* DH5α foi usada como controle negativo nessas reações. As cepas utilizadas como controles positivos para a pesquisa de adesinas pertencentes a diferentes patótipos de *E. coli* patogênicas estão descritas na Tabela 5.

A cepa *E. coli* R861 foi usada nas análises de perfil plasmideal e *Southern blot* (THRELFALL et al., 1986). E as cepas de *E. coli* K-12 DH5α albergando os plasmídeos pKD3 e pKOBEG.

Todas as cepas foram cultivadas em caldo ou ágar Luria-Bertani (LB) ou ágar MacConkey, acrescidos de antibióticos apropriados quando mencionado. Os estoques foram mantidos a -80 ºC em caldo TSB acrescido de 15% de glicerol.

3.2 Ensaios de interação em células epiteliais cultivadas

3.2.1 Cultivo e preparo das placas de células epiteliais

As linhagens celulares HEp-2 e HeLa foram cultivadas em garrafas de 50 mL (Nunc, Dinamarca) contendo 12 mL de Meio Mínimo Essencial de Eagle, modificado por Dulbeco (DMEM; Cultilab, Brasil), contendo antibióticos (penicilina 1000 U/mL e estreptomicina 1 mg/mL; Sigma-Aldrich, EUA), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab) e

mantidas por 2 a 3 dias a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO_2. Após esse período as células foram transferidas para placas de 24 cavidades (Nunc) contendo lamínulas de vidro, em uma concentração de 5 x 10^4 células/mL, e incubadas por 48 h sob as mesmas condições. As células T84 e HT-29 foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM/F12; Cultilab) e DMEM (Cultilab), respectivamente, acrescidos de 5 mM de galactose e de 10% soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e mantidas por 10 a 12 dias a 37 ºC sob atmosfera de 10% O_2 e 90% CO_2 em placas de 24 cavidades (Nunc) contendo lamínulas de vidro.

3.2.2 Ensaio de adesão qualitativo e quantitativo

Testes de interação da cepa Ec46/88 e seus mutantes em *aggC* e *ecpC*, dos controles 17-2, E2348/69, 042 e DH5α foram realizados em células epiteliais cultivadas segundo a metodologia descrita por Cravioto et al. (1979).

Para a realização dos ensaios de adesão as cepas bacterianas foram cultivadas em 3 mL de caldo Luria-Bertani (LB), a 37 ºC por 18 h em condições estáticas. As placas contendo as células foram lavadas por 5 vezes com tampão salina fosfato (PBS) 1x (cloreto de sódio 137 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; fosfato de sódio dibásico 4,3 mM; fosfato de potássio monobásico 1,5 mM) pH 7,4. Posteriormente, 20 µl da cultura bacteriana foram adicionados a cada cavidade da placa contendo a monocamada de células, juntamente com 980 µl de meio DMEM sem antibiótico, contendo 2% de SFB e 1% de D-manose. Após as três primeiras horas de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS 1x, acrescidas de 1 mL de meio DMEM sem antibiótico (2% de SFB e 1% de D-manose), e incubadas por mais 3h a 37 °C. Em seguida as placas foram novamente lavadas 5 vezes com PBS 1x e fixadas com metanol 70% (Merk, Alemanha) por 30 min à temperatura ambiente. Após a fixação as células foram coradas por 5 min com corante eosina-azul de metileno em solução de May-Grünwald (Merck, Alemanha), diluído na razão 1:2 em tampão Sørensen (fosfato de potássio monobásico 8,6 mM; fosfato de sódio dibásico 28,6 mM). Em seguida, esse corante foi desprezado, sendo então acrescentada a solução corante azul-eosina-azul de metileno de Giemsa (Merck) diluída na razão 1:3 em tampão Sørensen, por 20 min. Após lavagem para retirada do excesso de corante, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente e montadas em lâminas com Entellan (Merck). As lâminas foram analisadas através de microscopia óptica sob aumento de 1.000 vezes.

Para o ensaio de quantificação da adesão as cepas foram cultivadas em placas de 24 cavidades sem lamínulas conforme descrito acima. Após as 6 h de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com PBS (1x) e então foi adicionado 1 mL de Triton X-100 a 1% em PBS (1x), seguido de incubação por 30 min para lise das células.

Para a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL foram realizadas diluições seriadas do lisado total e 0,1 mL de cada diluição foram semeados em placas de ágar LB para obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h. O número de colônias contadas nas placas foi multiplicado pelo fator de diluição e pela MOI usada (10:1). Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas para fins de cálculos estatísticos. Os valores obtidos a partir da média das contagens de UFC/mL foram analisadas pela média e erro padrão da média utilizando o software *GraphPad Prism* 5.0®.

3.2.3 Teste de FAS (*fluorescent-actin staining*)

O teste de detecção do acúmulo de actina após contato bactéria-célula em ensaios de 6 h, foi realizado segundo a metodologia descrita por Knutton et al. (1989). O cultivo das células epiteliais HEp-2, HeLa, T84 e HT-29, bem como os respectivos ensaios de adesão *in vitro*, foi realizado como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2. Após o período de incubação e lavagens com PBS 1x, as células foram fixadas com *p*-formaldeído 4%, diluído em PBS 1x, por 18 h a 4 ºC. As células foram novamente lavadas com PBS 1x e em seguida permeabilizadas pela adição de Triton X-100 0,5% em PBS 1x, por 4 min. Após novas lavagens, foram adicionados 5 µg/mL faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma-Aldrich, EUA) diluído em PBS 1x. As placas foram incubadas por 20 min sob abrigo de luz e novamente lavadas com PBS 1x, por três vezes de 5 min. Em seguida, as lamínulas foram removidas da placa, secas com papel de filtro e fixadas sobre lâminas de vidro com a utilização de Mowiol (Calbiochem, EUA). As lâminas foram mantidas por cerca de 20 h a 4 ºC, e em seguida, observadas através de microscopia confocal em aumento de 1.000 vezes, utilizando o microscópio LSM 510 Meta (Zeiss, Alemanha) e os filtros BP500-530IR (488 nm) e LP560 (543 nm).

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após os ensaios de aderência em células HeLa, realizado como descrito anteriormente no item 3.2.2, as cepas E2348/69, Ec46/88 e mutantes Δ*aggC e* Δ*ecpC*, foram fixadas em uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M; pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% e desidratadas com gradiente seriado de etanol (60, 70, 80, 90, 95 e 100%). Após secagem completa do material, realizada pelo método de ponto crítico do gás carbônico, as preparações foram montadas em suportes apropriados para microscopia de varredura, receberam uma fina camada de ouro e observadas ao microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 250), em 10 kV e distância de trabalho de 8,3 mm (KNUTTON, 1995).

3.3 Caracterizações genotípicas

3.3.1 Técnicas de biologia molecular

As técnicas gerais de biologia molecular que foram utilizadas neste estudo estão descritas em Ausubel et al. (1995) e Sambrook e Russel (2001).

3.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A pesquisa pelos genes de virulência plasmideais e cromossômicos associados à virulência de patótipos de *E. coli* diarreiogênicas foi realizada na cepa Ec46/88 através da PCR. As sequências dos iniciadores, os respectivos ciclos de amplificação e os tamanhos dos produtos amplificados encontram-se descritos nas Tabelas 2, 3, 4 e 5. Para cada reação foram utilizados 25 pmol de cada um dos iniciadores (*foward* e *reverse*), 1 U de *Taq* DNA *Polymerase* (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de $MgCl_2$, 5 µl do tampão de reação de PCR 10x concentrado (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 0,2 mM da mistura de dNTPs (dNTP, dCTP, dGTP e dTTP) ; 5 µl do DNA bacteriano das cepas e água deionizada estéril para um volume final de 50 µl. Os lisados bacterianos usados como DNA molde foram obtidos da seguinte forma: uma colônia isolada de uma placa de ágar LB

foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 500 µl de água MilliQ estéril, submetida à fervura por 10 min e imediatamente resfriada em banho de gelo.

Após a amplificação, os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. Os géis foram preparados por aquecimento, fundindo-se agarose (Invitrogen) em tampão TAE 1x (40 mM tris-acetato; 2 mM EDTA) na concentração final de 0,8% a 1%. Os fragmentos de DNA resultantes das PCR foram acrescidos de tampão de corrida 1x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%). Como marcador de peso molecular foram utilizados o *100 bp DNA ladder* (Invitrogen), *1 kb DNA ladder* (Invitrogen), *GeneRuler 1 kb DNA ladder* (ThermoScientific, Walthan, MA, USA), *low DNA mass ladder* (Invitrogen) ou *high DNA mass ladder*. Após a corrida eletroforética, realizada sob corrente constante de 70 V em tampão TAE 1x, os géis foram corados em solução de *GelRed* (Molecular Probes, Invotrogen, EUA) na concentração de 1:10.000 por 30 min e observados em transiluminador de luz ultravioleta UVP (Upland, EUA) e fotografados com o auxílio de sistema de imagem Alphaimager (Alpha Innotech, EUA).

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das reações de PCR para marcadores de virulência de EPEC e EHEC.

Gene	Sequência dos iniciadores	Anelamento	Fragmento	Referências
eae	(F) CTGAACGGCGATTACGCGAA	50 °C	917 pb	ARANDA *et al*,
	(R) CCAGACGATACGATCCAG			2004
bfpA	(F) GGTCTGTCTTTGATTGAATC	55 °C	485 pb	ELIAS *et. al.*,
	(R) TTTACATGCAGTTGCCGCTT			2002a
tir	(F) CACCTATAAGGCAGTCTGTTGCTG	56 °C	669 pb	Este estudo [a]
	(R) GGTTTCAGTTGCACTTGCAGCAG			
espA	(F) AAGAAAGATTATGAAGAGG	54 °C	653 pb	ROCHA *et al*.,
	(R) ACCTCACAGACTGGATAT			2011
espB	(F) AGTGAATATCCGTATTGTC	52 °C	1.069 pb	ROCHA *et al*.,
	(R) TCAAGATAGTAATTAAACAC			2011
espD	(F) CCGGCAGGCCACTCATTAGTGACG	61 °C	596 pb	Este estudo[b]
	(R) AGTGAAGACACCCCGCCAACGCCG			
EAF	(F) GGCTGCATTACCCAATATCAAG	60 °C	1.060 pb	FRANK *et.al.*,
	(R) GACCGAGAATGGCAGGGGAA			1994
stx1	(F) AGCTGAAGCTTTACGTTTTCGGG	62 °C	590 pb	TSEN; JIAN,
	(R)TTTGCGACTGAGAAGAAGAGA			1998
stx2	(F) TTTCCATGACAACGGACAGCAGTT	62 °C	694 pb	TSEN; JIAN,
	(R) ATCCTCATTATACTTGGAAAACTCA			1998

Sequências dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das reações de PCR para marcadores de virulência de EPEC e EHEC. (F) iniciador *foward*; (R) iniciador *reverse*.

[a] Iniciadores desenhados com base na sequência do gene *tir* da tEPEC E2348/69 (número de acesso no GenBank: AF022236).

[b] Iniciadores desenhados com base na sequência do gene *espD* da tEPEC E2348/69 (número de acesso no GenBank: AF022236).

Tabela 3 – Marcadores de virulência de EAEC pesquisados por reação de PCR.

Gene	Sequência dos iniciadores	Anelamento	Fragmento	Referências
aatA	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCAT (R) CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	50 °C	630 pb	SCHMIDT *et al*., 1995
astA	(F) CCATCAACACAGTATATCCGA (R) GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	58 °C	111 pb	YAMAMOTO *et al*., 1997
pic	(F) GTGTTTCAACCAGGTTCAACA (R) CCTTCACCAATTTTATGCAGT	52 °C	1.037 pb	GIOPPO *et al*., 2000
irp2	(F) AAGGATTCGCTGTTACCGGAC (R) TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	55 °C	264 pb	CZECZULIN *et al*., 1999
shf	(F) ACTTTCTCCCGAGACATTC (R) CTTTAGCGGGAGCATTCAT	51 °C	613 pb	CZECZULIN *et al*, 1999
rfbU	(F) ATGAATATACTATTTACGGAATC (R) CTACAGGCACAGAAAATGCCGATG	55 ºC	822 pb	FUJIYAMA *et al*., 2008
virK	(F)ATGTTTTCTATAAGTAACTTATCATT TATCGG (R) TTAATTTGAATTCTGATGTTCTGAG	55 °C	951 pb	FUJIYAMA *et al*., 2008
pilS	(F) ATGAGCGTCATAACCTGTTC (R) CTGTTGGTTTCCAGTTTGAT	50°C	534 pb	DUDLEY *et al*., 2006[a]
ap58	(F) GGATGGCGCGGGTTTCAGAGG (R) CCGCCCGGGCATTTGTCAGA	63 °C	591 pb	MONTEIRO-NETO *et al*., 2003
aaiA	(F) CCCACGAGTACCAGATAACG (R) GTTTTCAGGATTGCCATTAG	50 °C	476 pb	DUDLEY *et al*., 2006[b]
aaiC	(F) AAAAAATCTAGATGTCAAATAGAGA TATAGGTG (R) TATATATCTAGAAACAACCTTAAATG ATGAGT	53 °C	278 pb	DUDLEY *et al*., 2006[b]

Sequências dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das reações de PCR para marcadores de virulência de EAEC. (F) iniciador *foward*; (R) iniciador *reverse*.

Tabela 4 - Sequências dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das reações de PCR para os genes das fímbrias AAF de EAEC.

Gene	Sequência dos iniciadores	Anelamento	Fragmento	Referências
aggA	(F) TTAGTCTTCTATCTAGGG (R) AAATTAATTCCGGCATGG	55 °C	450 pb	CZECZULIN *et al.*, 1999
aggB	(F) GCGGTGTACTTGTGATGGT (R) ATAGCCTGTTTTTCTTCTCCT	57 ºC	316 pb	Este estudo [a]
aggC	(F) TATTAAACCATGGTAAGC (R) ACCAAGATCCGAGATTGA	45 °C	538 pb	GIOPPO *et al.*, 2000
aggD	(F)CTCTACAATCAAGCCGCC (R)CATTTACAGGCATCGGATATT	57 ºC	402 pb	Este estudo [b]
aggR	(F) CTAATTGTACAATCGATGTA (R) ATGAAGTAATTCTTGAAT	40 °C	308 pb	CZECZULIN *et al.*, 1999
aafA	(F) TCAGAATGTTTGCGATTGCT (R) ATTTGTCACAAGCTCAGCAT	59 °C	470 pb	GIOPPO *et al.*, 2000
aafC	(F) GTTATAGCTCGCACATATTC (R) TGCAGACTGATAATGCTC	68 °C	1.144 pb	ELIAS *et al.*, 2002b
agg3A	(F) GTATCATTGCGAGTCTGGTATTCAG (R) GGGCTGTTATAGAGTAACTTCCAG	65 °C	462 pb	BERNIER *et al.*, 2002
agg3C	(F) GTTTGGAACCGGGAATTAACATTG (R) ATACTTTAGATACCCCTCACGCAG	58 °C	485 pb	BERNIER *et al.*, 2002
agg4A	(F) TCCATTATGTCAGGCTGCAA (R) GGCGTTAACGTCTGATTTCC	59 °C	411 pb	BOISEN *et al.*, 2008
agg4A	(F) TGAGTTGTGGGGCTAYCTGGA (R) CACCATAAGCCGCCAAATAAGC	57 ºC	169 pb	BOISEN *et al.*, 2008
agg4C	(F) ATATGTTTAATCGGTTCTTTA (R)ACCATCTGATTCTAATACCGT	55 °C	1.000 pb	Este estudo [c]

(F) iniciador *foward*; (R) iniciador *reverse.*

[a] Iniciadores desenhados com base na sequência do gene *aggB* da EAEC 17-2 (número de acesso no GenBank: U12894).

[b] Iniciadores desenhados com base na sequência do gene *aggD* da EAEC 17-2 (número de acesso no GenBank: U12894).

[c] Iniciadores desenhados com base na sequência do gene *agg4C* da EAEC C1010-00 (número de acesso no GenBank: EU637023.1).

Tabela 5 – Tabela dos genes de fímbrias de *E. coli* patogênicas pesquisados por reação de PCR.

(continuação)

Gene	Controle positivo (sorotipo)	Sequência dos iniciadores	Anelamento	Fragmento	Referência
fimA	UPEC J96 (O4:K⁻:H5)	(F) CTGTCGGCTCTGTCCCTCAGT (R) GATGCGGTACGAACCTGTCCTAA	65 °C	161 pb	Nowrouzian et al., 2005
fimH	UPEC J96 (O4:K⁻:H5)	(F) GAC GTCACCTGCCCTCCGGTA (R) TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	63 °C	508 pb	Abe et al., 2008
papA	UPEC J96 (O4:K⁻:H5)	(F) CACATTATCACCATCTTTC (R) TCTATTGATTTTGGACAGC	50 °C	306 pb	Le Bouguenec et al., 1992
aida-I	DAEC 2787 [a] (O126:H27)	(F) GTTTCTCTCTGATGGTTATGC (R) AACATTGACCATACCGAAG	60 °C	342 pb	Abreu et al., 2013
sfaA	UPEC RS218 [a] (O18:K1:H7)	(F) CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC (R) CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	50 °C	410 pb	Le Bouguenec et al., 1992
pilS	EAEC C1096 (Não determinado)	(F) ATGAGCGTCATAACCTGTTC (R) CTGTTGGTTTCCAGTTTGAT	50 °C	537 pb	Dudley et al., 2006[a]
pilV	EAEC C1096 (Não determinado)	(F) GGATCCATGCAAAAAGACAACGATAA (R) AAGCTTTTAATTGAGCGTTACACACG	50 °C	1.194 pb	Dudley et al., 2006[a]
sfpA	STEC SF12 [a] (O157:H⁻)	(F) AGCCAAGGCCAAGGGATTATTA (R) TTAGCAACAGCAGTGAAGTCTC	64 °C	440 pb	Brunder et al., 2001
lpfA O113	STEC 50 [a] (O87:H16)	(F) ATGAAGCGTAATATTATAG (R) TTATTTCTTATATTCGAC	52 °C	573 pb	Doughty et al.,2002

TABELA 5 – Tabela dos genes de fímbrias de *E. coli* patogênicas pesquisados por reação de PCR.

(continuação)

lpfA1 (A1-A)	tEPEC E2348/69	(F) AGTTGGTGATAAATCACCAT	59 °C	222 pb	Torres et al., 2009
	(O127:H6)	(R) GTGCTGGATTCACCACTATTCATCG			
lpfA1 (A1-B1)	STEC FV10094 [a]	(F) AAGTCTGTATTTACTGCTATG	57 °C	273 pb	Torres et al., 2009
	(O26:H11)	(R) GAAATACAGAACGGTCTGA			
lpfA1 (A1-C)	EHEC EDL933	(F) GGTTGGTGACAAATCCCCG	62 °C	244 pb	Torres et al., 2009
	(O157:H7)	(R) CGTCTGGCCTTTACTCAGA			
lpfA1	aEPEC FV10106 [a]	(F) GGTTGGTGACAAATCCCCG	60 °C	273 pb	Torres et al., 2009
(A1-C_F/A1-$C1_R$)	(O145:H28)	(R) GAGAACCGTCTGGCCTGTTT			
lpfA2 (A2-B1)	tEPEC FV10132 [a]	(F) GGTAGTCTGGCGTCGCCACAGA	60 °C	207 pb	Torres et al., 2009
	(O119:H8)	(R) AATACGAATACCAACGCCG			
ecpA	tEPEC E2348/69	(F) GCCGCTGATGATGGAGAAAG	55 °C	384 pb	Saldaña *et. al*., 2009
	(O127:H6)	(R) GCAACAGCCAAAAAAGACACC			
ldaH	*E. coli* 22 [a]	(F) ATGGACAGAGTGGAGACAG	64 °C	560 pb	Scaletsky *et al*, 2005
	(O26:H11)	(R) GCCACCTTTATTCTCACCA			
CS21/*lngA*	ETEC E9034A [a]	(F) AAAAATCGCCAAATACCAT	55 °C	588 pb	Nara, 2012
	(O8:H9)	(R) GTTTGTCCATTGTTACCT			
CFA/I	ETEC H10407	(F) GCTCTGCAAACAATGTTTG	54 °C	364 pb	Ghosal et al., 2007
	(O78:H11)	(R) TTACACCGGATGCAGAATA			
CFA/III	ETEC 220A1 [a]	(F) GCCTTCTGGAAGTCATCAT	52 °C	437 pb	Ghosal et al., 2007
	(O25:H^-)	(R) TGCCACATACTCCCAGTTA			
CS1	ETEC 170A1 [a]	(F) TTGACCTTCTGCAATCTGA	54 °C	324 pb	Ghosal et al., 2007
	(O6:H16)	(R) CATCTGCATGGATTGTTGAAAG			

TABELA 5 – Tabela dos genes de fímbrias de *E. coli* patogênicas pesquisados por reação de PCR.

(conclusão)

CS2	ETEC E4833 [a]	(F) GAGAAAAATATCACTGTAACTG	57 °C	385 pb	Nara, 2012
	(O6:H16)	(R) TATTAGTTTGCTGGGTGCTTC			
CS3	ETEC PB176 [a]	(F) GGTGGGTGTTTTGACTCTT	54 °C	264 pb	Ghosal et al., 2007
	(O6:H16)	(R) TGTTCGTTACCTTCAGTGG			
CS4	ETEC E8775 [a]	(F) TTTTGCAAGCTGATGGTAG	54 °C	250 pb	Ghosal et al., 2007
	(O25:H42)	(R) TCTGCAGGTTCAAAAGTCA			
CS5	ETEC 4961-2 [a]	(F) CGGATTGGATATACCGTTT	54 °C	453 pb	Ghosal et al., 2007
	(O29:H21)	(R) TCAACAGCAAATGTTACCG			
CS6	ETEC E1708A [a]	(F) TTTTGCAAGCTGATGGTAG	54 °C	250 pb	Ghosal et al., 2007
	(O167:H5)	(R) TCTGCAGGTTCAAAAGTCA			

Sequência dos iniciadores, controles positivos da reação, tamanhos dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento dos ciclos de amplificação das reações de PCR para pesquisa dos genes de fímbrias de *E. coli* patogênicas.

[a] Cepas pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

3.3.3 Análise filogenética

A cepa Ec46/88 foi também analisada quanto aos seguintes genes metabólicos utilizados para análise filogenética: *arcA* (*aerobic respiratory control protein*), *icd* (*isocitrate dehydrogenase*), *mtlD* (*manitol* 1-*phosphate dehydrogenase*) e *rpoS* (*sigma fator S*) (REID *et al*., 2000).

O DNA genômico da cepa bacteriana foi obtido com auxílio do *kit* de extração *Wizard genomic DNA Purification kit* (Promega, Madison, WI, USA), seguindo recomendações do fabricante. A integridade e quantificação do DNA extraído foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 1% (item 3.3.2) e para a quantificação foi comparado com padrões de massa de DNA *high DNA mass ladder* (Invitrogen). Para as reações de amplificação foram usados 5 ng/µl de DNA genômico diluído em água bidestilada e estéril.

As amplificações dos genes foram realizadas com os iniciadores descritos na Tabela 6 e os reagentes para PCR descritos no item 3.3.2. O ciclo utilizado para esses genes foi o seguinte: 35 ciclos (95 ºC/ 45 seg, 55-65 ºC/ 45 seg, 72 ºC/ 2 min) com uma denaturação inicial de 95 ºC por 5 min e extensão final de 72 ºC por 7 min.

As reações foram visualizadas e quantificadas em gel de agarose (item 3.3.2), e submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos. O sequenciamento foi realizado no Centro de estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo). As análises das sequências dos genes foram realizadas utilizando o software BioEdit. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando o programa ClustalW. As sequências parciais dos genes foram concatenadas e exportadas para o programa MEGA (versão 5.0.5) para a inferência da árvore filogenética. A distância genética entre as cepas foi obtida pelo método Kimura-2 parâmetros e o filograma foi construído através do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1000 réplicas.

Tabela 6 – Tabela dos genes utilizados para a análise filogenética.

Gene	Iniciadores	Sequência dos iniciadores	Referência
arcA	*arcAp1* [a,c]	GAAGACGAGTTGGTAAACACG	BEUTIN et al.,2005
	arcAp2NW [b,c]	CTTCCAGATCACCGCAGAAGC	
icd	*icdp1* [a,c]	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	REID et al., 1999
	icdp2 [b]	TTACAT(GA)TT(CT)T(TC)GATGATCGC	
	icdp637F [c]	GGCTTAATACCGATACCGCA	
rpoS	*rposp-1* [a,c]	GGCCTTCAACCTGAATCTGG	REID et al., 1999
	rposp-2 [b,c]	TGATGAGAACGGAGTTGAGG	
mtlD	*m1pp1* [a]	CACCAGCGTGGATGAAGTGC	REID et al., 1999
	m1pp2 [b,c]	CGGTTACCGCTCGGATACAA	
	m1pp3 [c]	CGTTGATCTGATTGCTCAGG	

[a] iniciadores *foward.*
[b] iniciadores *reverse.*
[c] iniciadores usado para o sequenciamento.

3.3.4 Análise do perfil plasmideal

Nesses ensaios, além da cepa Ec46/88 foram utilizados os controles EAEC 17-2 (controle do plasmídeo pAA1) e *E. coli* R861 (amostra que alberga quatro plasmídeos com massas moleculares conhecidas). A extração plasmideal foi realizada com o *PureYield® Plasmid Midiprep kit* (Promega), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA plasmideal foi analisado em eletroforese em gel de agarose e corado em solução de *GelRed* para análise fotográfica, conforme descrito no item 3.3.2.

3.3.5 Hibridização por *Southern blot*

As extrações plasmideais das cepas Ec46/88, 17-2 e R861 foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (item 3.3.2). Após a eletroforese o gel de agarose foi tratado com solução de HCl 0,25 M durante 30 min sob leve agitação. Em seguida o gel foi lavado com água destilada e tratado com solução de NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M (solução desnaturante) por 30 min sob agitação lenta. O gel foi novamente lavado com água destilada e tratado com solução de Tris-HCl 1 M/NaCl 2 M (solução neutralizante) por 30 min sob leve agitação.

Após esse tratamento, os plasmídeos foram transferidos para uma membrana de *nylon* carregada positivamente (Hydond-N+, GE Healthcare, Reino Unido) utilizando o sistema a vácuo VacuGene XL *Vacuum Blotting System*, (Pharmacia Biotech, Suécia), segundo recomendações do fabricante.

Após a transferência, as membranas de *nylon* foram hibridizadas separadamente com as sondas *aatA*, *aggA*, *aggC* e *aggR* marcadas, conforme descrito a seguir. As sondas foram preparadas a partir dos respectivos fragmentos amplificados da cepa protótipo 17-2 obtidos por PCR (item 3.3.2). Após a amplificação, seguida da eletroforese em gel de agarose, os fragmentos foram excisados dos géis e eluídos com auxílio do *illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare). A marcação dos fragmentos sonda e a hibridização das membranas foi realizada com o auxílio do *kit ECL Nucleic Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Após a hibridização, a membrana foi exposta a um filme de raios-X durante 5 a 30 min e em seguida o filme foi revelado com auxílio do revelador e fixador de filme de raio X (Kodak, EUA), segundo recomendações do fabricante.

3.3.6 Sequenciamento dos genes do operon que codificam as fímbrias AAF/I e ECP

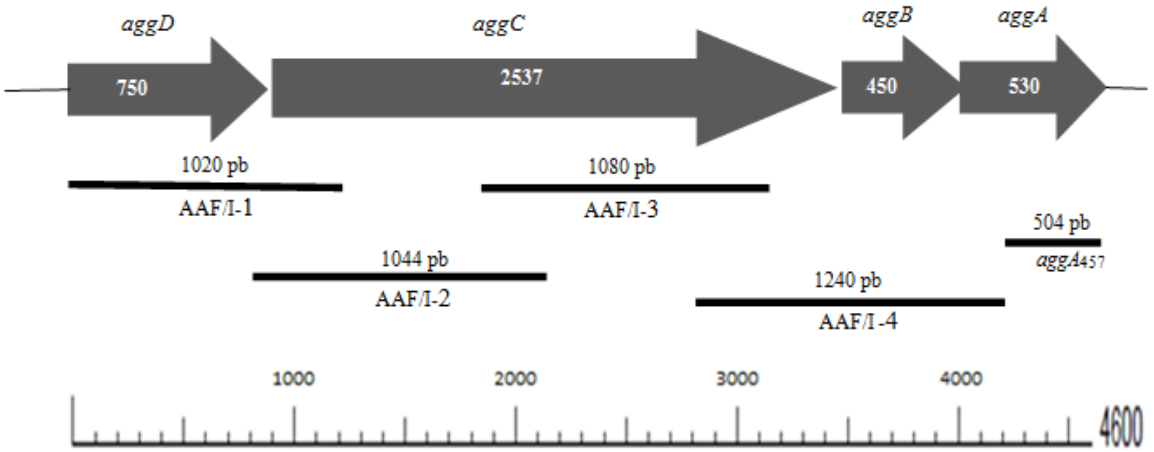
Para o sequenciamento dos genes que codificam as adesinas AAF/I (operon *agg*) e ECP (operon *ecp*) na cepa Ec46/88, foram construídos iniciadores (*walking-primers*) que amplificavam fragmentos ao longo da sequência dos dois operons, conforme apresentado nas figuras 4 e 5.

Após a amplificação dos respectivos fragmentos obtidos conforme descrição no item 3.3.1, os mesmos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (item 3.3.2) e purificados com utilização do *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante. A quantificação foi realizada comparando-se a intensidade da banda obtida com as bandas do marcador *low DNA mass ladder* (Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose a 1% (item 3.3.2).

Foram utilizados para os sequenciamentos aproximadamente 20 ng/µl de DNA purificado referente a cada fragmento amplificado, juntamente com 5 pmol de cada um dos iniciadores *forward* e *reverse*, separadamente. As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da

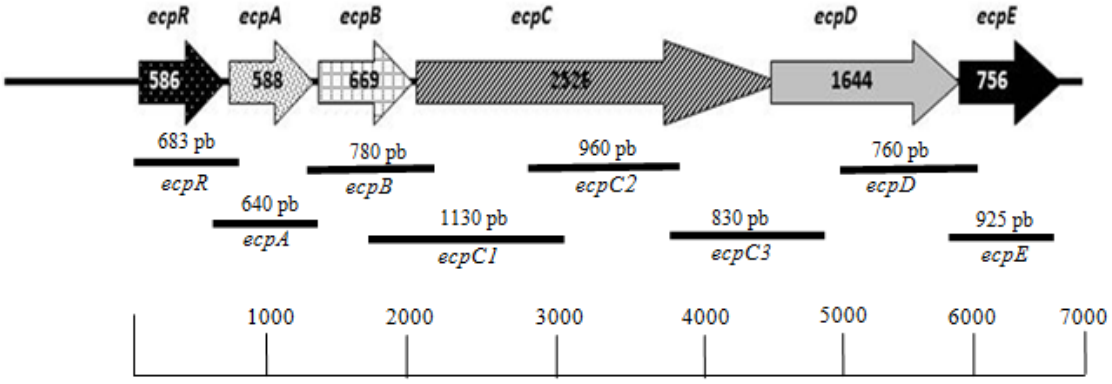
Universidade de São Paulo. As sequências obtidas para cada um dos genes foram alinhadas através do software *Bioedit* e foram comparadas às sequências de DNA depositadas no *GenBank* utilizando o programa *Blastn.* Os iniciadores construídos para o sequenciamento, as temperaturas de anelamento e os tamanhos dos fragmentos amplificados pela reação de PCR estão contidos nas tabelas 7 e 8.

Figura 4 - Esquema de construção dos iniciadores para sequenciamento do operon *aggDCBA*.



Esquema da construção dos iniciadores para sequenciamento do operon da fímbria AAF/I da amostra Ec46/88 a partir da sequência da amostra 17-2 (número de acesso no GenBank: U12894).

Figura 5 - Esquema de construção dos iniciadores para sequenciamento do operon *ecpRABCDE*.



Esquema da construção dos iniciadores para sequenciamento do operon da fímbria ECP da amostra Ec46/88 a partir da sequência da amostra E2348/69 (número de acesso no GenBank:NC_011601).

Tabela 7 – Tabela dos genes utilizados para sequenciamento do operon da fimbria AAF/I da cepa Ec46/88.

Fragmento	Sequência dos iniciadores	Anelamento	Produto amplificado
AAF-1[a]	(F) CAAGTCATAGCGATGAAGATT (R) CCATGCCTATTTTTTTTTGTG	56 ºC	1.020 pb
AAF-2 [a]	(F) AAACCATGGTAGCGGGGG (R) GTCAATTGTCCAAGATATGCT	58 ºC	1.044 pb
AAF-3 [a]	(F) GAACGGTGGTGACTTGCA (R) GCCATTGTATCATCAGTTTTC	56 ºC	1.080 pb
AAF-4[a]	(F) TGGACAAAAGCTATACTGGG (R) ACCATCACAAGTACACCG	56 °C	1.240 pb
aggA$_{457}$[b]	(F) ATGAAAACATTAAAAAATATGAG (R) CTAGAGTCGACCTGCAGC	55 °C	504 pb

Sequência dos iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanhos dos fragmentos amplificados nos ciclos das reações de PCR para sequenciamento dos genes do operon da fimbria AAF/I da cepa Ec46/88.
(F) iniciadores *foward*; (R) iniciadores *reverse*.
[a] Iniciadores desenhados com base na sequência do operon *agg* da EAEC 17-2 (número de acesso no GenBank: U12894).
[b] Iniciadores desenhados com base na sequencia do gene variante *aggA*$_{457}$ (número de acesso no GenBank: Y18149).

Tabela 8 - Tabela de genes utilizados para sequenciamento do operon da fimbria ECP da cepa Ec46/88.

(continuação)

Fragmentos	Sequência dos iniciadores [a]	Anelamento	Produto amplificado
ecpR	(F) CTGTAAAAATTATAGGTTTGG (R) ACCAGAGCTATTGCCAGA	57 ºC	683 pb
ecpA	(F) ACCTCGGGAAGAAAAGCAAT (R) CAATTCGTCCAGGAATAAA	56 ºC	640 pb
ecpB	(F) TCTGATGTACCAGCAGGG (R) CTTTCAGTCCTGGGGAGA	56 ºC	780 pb
ecpC1	(F) ACGACAATGCCTTTACGAC (R) CGATCCATATGAAAGCTACC	57 °C	1.130 pb
ecpC2	(F) GCAAACGCACCCAGCGG (R) TCCGCCCGCTGGCAGC	57 °C	960 pb
ecpC3	(F) ATCAATACCAATTTGACCCG (R) TTCCTGAACATTGTATTTTAAA	51 °C	830 pb

Tabela 8 - Tabela de genes utilizados para sequenciamento do operon da fimbria ECP da cepa Ec46/88.

(conclusão)

ecpD	(F) AGTTTGTGTTGTCGAAAACA (R) GCCGAGGCTAACGACGA	56 °C	760 pb
ecpE	(F) CGAAGGGAATGCCGACTG (R) TTAGTTAATGTTACGCCACG	57 °C	925 pb

Sequência de iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanhos dos fragmentos amplificados nos ciclos das reações de PCR para sequenciamento dos genes do operon da fimbria ECP da cepa Ec46/88. (F) iniciadores *foward*; (R) iniciadores *reverse*.
[a] Iniciadores desenhados com base na sequência do operon *ecp* da tEPEC E2348/69 (número de acesso no GenBank: NC_011601).

3.4 Mutagênese sítio dirigida

3.4.1 Obtenção de mutantes nos genes *aggC* e *ecpC* na cepa Ec46/88

A metodologia empregada na construção dos mutantes Δ*aggC e* Δ*ecpC* da cepa Ec46/88 foi baseada na técnica de mutagênese sítio dirigida com auxílio do sistema de recombinase Red codificada pelo fago λ (DATSENKO; WANNER, 2000).

Resumidamente, a metodologia se baseia na ancoragem do vetor pKOBEG (CHAVEROCHE et al., 2000) na cepa selvagem Ec46/88, seguida da inserção de um fragmento linear de DNA contendo o cassete de resistência ao cloranfenicol e 60 nucleotídeos das regiões adjacentes aos genes *aggC* ou *ecpC* e seleção dos mutantes após a recombinação homóloga.

Para a realização da recombinação alélica, inicialmente o fragmento contendo o cassete de resistência ao cloranfenicol foi amplificado por PCR (item 3.3.1) a partir do vetor pKD3, com auxílio de iniciadores que além de se anelarem na sequência do cassete, possuem 60 pb de homologia às regiões adjacentes aos genes *aggC e ecpC*, respectivamente. As sequências dos iniciadores, descritas na tabela 9, foram originadas a partir das sequências de *aggC* e *ecpC* obtidas no sequenciamento (item 3.3.6) dos respectivos operons da cepa Ec46/88 realizados no presente estudo. Os reagentes foram utilizados nas seguintes condições: 2 µl de DNA plasmidial pKD3 (aproximadamente 50 ng); 5 µl dos iniciadores (10 picomoles/µl); 1 µl de dNTP (40mM); 5 µl de $MgCl_2$ (40 mM); 5 µl de tampão de reação (10 X concentrado); 0,5 µl de *High Fidelity Taq* DNA polimerase 100 U (Fermentas, EUA) e

água MiliQ estéril, em um volume final de 50 µl. As condições da PCR foram: desnaturação a 95 °C por 4 min; 35 ciclos (95 °C por 30 seg; 50 °C por 1 min; 72 °C por 1 min e 45 seg); e extensão final a 72 °C por 7 min.

Foram realizadas 20 reações como descrito acima e os produtos das 20 reações de PCR foram purificados em gel de agarose a 0,8%. Após a corrida o gel foi corado e a banda visualizada sob luz ultravioleta (item 3.3.2). O fragmento correspondente ao produto esperado foi excisado do gel e purificado com o auxílio do *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante. Em seguida o DNA foi tratado com a endonuclease *DpnI* (10 U/µl) (Fermentas) para eliminação de remanescentes de DNA cromossômico. A seguir, o material foi lavado por 3 vezes em 1 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), precipitado em 1 mL de solução isopropanol:acetato de potássio (88%:0,2 mM) a -80°C por 18 h. Após essa incubação esse material foi centrifugado por 30 min a 13.000 rpm, sob refrigeração a 4 °C e, em seguida, o pellet foi lavado em etanol 70% gelado e ressuspenso em 100 µl de água MiliQ estéril. A quantificação foi realizada comparando-se a intensidade da banda obtida com as bandas do marcador *low DNA mass ladder* (Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose a 1% (item 3.3.2).

Concomitantemente, o plasmídeo pKOBEG que contém os genes que codificam as recombinases foi inserido na cepa selvagem Ec46/88 por eletroporação. As células eletrocompetentes foram preparadas conforme descrição a seguir. A amostra de Ec46/88 foi pré-cultivada em 3 mL de caldo LB durante 18h a 37 ºC, sob agitação constante de 300 rpm. Uma alíquota de 3 mL de pré-inóculo da amostra foi transferida para 250 mL de caldo LB e a cultura cultivada sob as mesmas condições anteriores, até atingir a absorbância de 0,5 a 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. As células bacterianas foram então incubadas em banho de gelo por 15 min, transferidas para um tubo de centrifugação pré-resfriado e centrifugadas por 20 min a 5.000 g sob refrigeração de 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com 250 mL de água deionizada estéril resfriada a 4 ºC. As células foram gentilmente ressuspensas em 30 mL de glicerol a 10% resfriado a 4 ºC e novamente centrifugadas a 5.000 g por 10 min sob refrigeração a 4 ºC. Ao sedimento bacteriano foram adicionados 300 µL de glicerol a 10% resfriado a 4 ºC para ressuspender gentilmente as células bacterianas. Essa suspensão foi aliquotada em volumes de 50 µL em tubos de polipropileno de 1,5 mL pré-resfriados e imediatamente congeladas a - 80 ºC.

Para a transformação, as células eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo e aproximadamente 100 ng do plasmídeo pKOBEG, que foi extraído previamente com o auxílio do *PureYield® Plasmid Midiprep kit* (Promega), segundo recomendações do fabricante, foi adicionado em 50 µl de célula competente. Essa mistura foi transferida para cubetas apropriadas de 0,2 cm (Bio-Rad, EUA) previamente resfriadas e eletroporadas com auxílio do eletroporador *GenePulser* (Bio-Rad) sob as condições de 2,5 kV, 25 µF e controle de pulso a 200 Ω. Após a eletroporação, foi adicionado imediatamente 1 mL de meio SOC (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; cloreto de sódio 10 mM; cloreto de potássio 2,5 mM; sulfato de magnésio 20 mM; cloreto de magnésio 10 mM; glicose 20 mM) à reação, e a mesma foi incubada a 30 ºC durante 1h sob agitação de 250 rpm. As células eletroporadas foram semeadas em volumes de 100, 200 e 300 µL em placas de ágar LB contendo apramicina na concentração de 100 mµg/mL. As placas foram incubadas por 24 h, a 30 ºC. Em seguida, foras inoculados em 100 mL de meio LB, 5 a 7 colônias frescas obtidas da eletroporação do dia anterior. A cepa selvagem Ec46/88 contendo pKOKEG foi cultivada em meio LB com 50 mM de L-arabinose sob agitação até atingir a absorbância de 0,8 em comprimento de onda de 600 nm e preparada para eletrocompetência de acordo com a metodologia descrita acima. Em seguida foram transformadas com diluições seriadas do fragmento linear de DNA purificado, seguido da seleção de transformantes em placas contendo cloranfenicol (20 µg/mL). Para verificação da troca alélica, as colônias obtidas foram selecionadas em placas de ágar LB contendo apramicina (100 µg/mL) ou cloranfenicol (20 µg/mL). As colônias capazes de crescer em meio contendo cloranfenicol, e que não crescer em apramicina (perda do plasmídeo), foram selecionados e armazenados a -80°C em caldo LB contendo 20 µg/mL de cloranfenicol e 15% de glicerol.

Iniciadores flanqueando os genes *aggC* e *ecpC* foram utilizados em reações de PCR (item 3.3.2) para verificar a ocorrência de recombinação homóloga. Uma vez que o cassete de cloranfenicol apresenta aproximadamente 1 kb e substituiu o gene *aggC* que apresenta em torno de 2,5 kb , ou o fragmento do gene *ecpC* , com aproximadamente 3,4 kb, os produtos amplificados devem apresentar um fragmento menor ao esperado. Para verificação da obtenção dos clones recombinados, um iniciador *foward* referente ao cassete de cloranfenicol (CmDT) também foi utilizado (Tabela 9).

Tabela 9- Iniciadores e plasmídeos utilizados para a mutagênese.

Gene/Plasmideo	Iniciadores/Caracterisitcas genotipicas	Referência
*agg*ʎ*Red*-F	(F) ACATCATCTTTCATAATAGTCATTCTTTTGTGTTTTCGAATA GAAAATGTAATCGCACATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Este estudo[a]
agg-ʎ*Red*-R	(R) TTACATACACACTGCACGGGTCAGAAAAATTCCTGACATTC CCTTTTTTAGTGGCAGTTTCATATGAATATCCTCCTTAG	Este estudo[a]
*ecp*ʎ*Red*-F	(F) ATGAAAAAGCACCTTCTGCCTCTCGCTCTGCTGTTTTCCGGA ATATCACCGGCCCAGGCCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Este estudo[a]
*ecp*ʎ*Red*-R	(R) CGCGGATCCAGCGCCCCGCCAGGAGTGACGAAAAAGTTGT CGTCTGAGTTGTTTTCGACACATATGAATATCCTCCTTAG	Este estudo[a]
CmDT-F	(F) TTATACGCAAGGCGACAAGG	Datsenko, Wanner, 2000
AAF-4'-R	(R) ACCATCACAAGTACACCG	Este estudo[a]
pKOBEG-Apra[b]	Plasmideo contendo os genes do fago ʎ red e gene que codifica resistencia a apramicina (Apra[r])	Chaveroche et al., 2000
pKD3	Plasmideo contendo gene de resistencia a cloranfenicol (*cat*)	Datsenko, Wanner, 2000

(F) iniciadores *foward*; (R) iniciadores *reverse*; o trecho sublinhado representa a parte da sequência pertencente ao pKD3.
[a] Iniciadores desenhados com base nas sequências dos respectivos genes obtidas no presente estudo.
[b] Plasmídeo gentilmente cedido pela Profa. Tânia A. T. Gomes (Disciplina de Microbiologia, UNIFESP).

3.4.2 Análises fenotípicas dos mutantes

Ambos os mutantes foram analisados quanto à curva de crescimento em caldo LB, adesão qualitativa (microscopia ótica e de varredura) e quantitativa em células HeLa e capacidade de agregação de actina em células HeLa (teste de FAS).

As curvas de crescimentos das cepas mutantes Ec46/88 Δ*aggC* e Ec46/88 Δ*ecpC* foram obtidas correlacionando as leituras de absorbância dos meios de cultura em determinados intervalos de tempo, segundo as condições de cultivo descritas a seguir. Inicialmente a cepa selvagem foi cultivada em 3 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/µl) e a cepa mutante em 3 mL de LB com ampicilina (100 µg/µl) e cloranfenicol (20 µg/µl), ambas a 37 °C por 18h. Uma alíquota de 1 mL dessas culturas foi transferida para 100 mL de LB com os respectivos antibióticos, sendo incubados a 37 °C sob agitação de 250 rpm. O crescimento bacteriano das cepas foi monitorado a cada 30 min durante 8h, através de leituras de absorbância em comprimento de onda de 600 nm, utilizando o espectrofotômetro Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech, EUA).

Os testes de adesão em células HeLa (qualitativo e quantitativo) foram realizados conforme a descrição no item 3.2.2. O teste de FAS para detecção da capacidade de causar a lesão A/E em células HeLa foi realizado segundo descrição anterior (item 3.2.3). A interação com células HeLa também foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (item 3.2.4).

4 RESULTADOS

4.1 Análises genotípicas e fenotípicas da cepa Ec46/88

4.1.1 Pesquisa de marcadores de virulência de EPEC e EHEC

A cepa deste estudo foi avaliada quanto à presença dos principais genes da região LEE de EPEC/EHEC, do plasmídeo pEAF de tEPEC e da toxina Shiga de EHEC. Conforme mostrado na Tabela 10, os genes *eae*, *tir* e *espB* foram amplificados com os tamanhos esperados para os mesmos genes da tEPEC E2348/69 (917 pb, 669 pb e 1.069 pb, respectivamente). Não houve detecção dos genes *espA* e *espD*. Cabe salientar que os iniciadores utilizados na detecção dos genes *esp* foram baseados na sequência de nucleotídeos da tEPEC E2348/69. Também não houve detecção do gene *bfpA* e do fragmento EAF, marcadores do plasmídeo pEAF de tEPEC, bem como das variantes 1 e 2 da toxina Stx, característica de EHEC.

Tabela 10 – Detecção dos marcadores de virulência de EPEC e EHEC na cepa Ec46/88.

Gene ou fragmento	Fragmento amplificado	Resultado
eae	917 pb	+
tir	669 pb	+
bfpA	-	-
EAF	-	-
espA	-	-
espB	1.069 pb	+
espD	-	-
stx1	-	-
stx2	-	-

Resultados dos ensaios de detecção dos genes de virulência de EPEC/EHEC na cepa Ec46/88. A tabela descreve os genes pesquisados, os tamanhos dos fragmentos amplificados e os resultados da pesquisa por PCR.

4.1.2 Análises de interação com células epiteliais cultivadas

O teste de adesão foi realizado em paralelo com o teste de FAS para a detecção de actina polimerizada no sítio da adesão bacteriana, indicativo da formação da lesão A/E. Os

dois testes foram realizados com as seguintes linhagens celulares: HEp-2, HeLa, T84 e HT-29. Conforme apresentado na Figura 6, a cepa Ec46/88 apresentou adesão agregativa nos testes de adesão em todas as linhagens celulares avaliadas, em ensaios de 6 h de incubação bactérias-células. Nota-se a produção do padrão AA preferencialmente sobre a lamínula na ausência de células, também conhecido como AA *coverslip*, ou AAcs (ELIAS et al., 2002b).

Com relação ao teste de FAS, também em ensaios de 6 h, foi detectado acúmulo de actina polimerizada sob a adesão bacteriana somente nas linhagens celulares HeLa e HT-29

Esses resultados confirmam o fenótipo de adesão agregativa, tanto em linhagens epiteliais não intestinais (HEp-2 e HeLa) como em linhagens de origem intestinal (HT-29 e T84). Além disso, a cepa Ec46/88 foi capaz de polimerizar a actina e formar o pedestal em células HeLa e HT-29, característica de cepas de EPEC.

Figura 6 - Ensaios de adesão e FAS com a cepa Ec46/88 em diferentes linhagens celulares. (continuação)

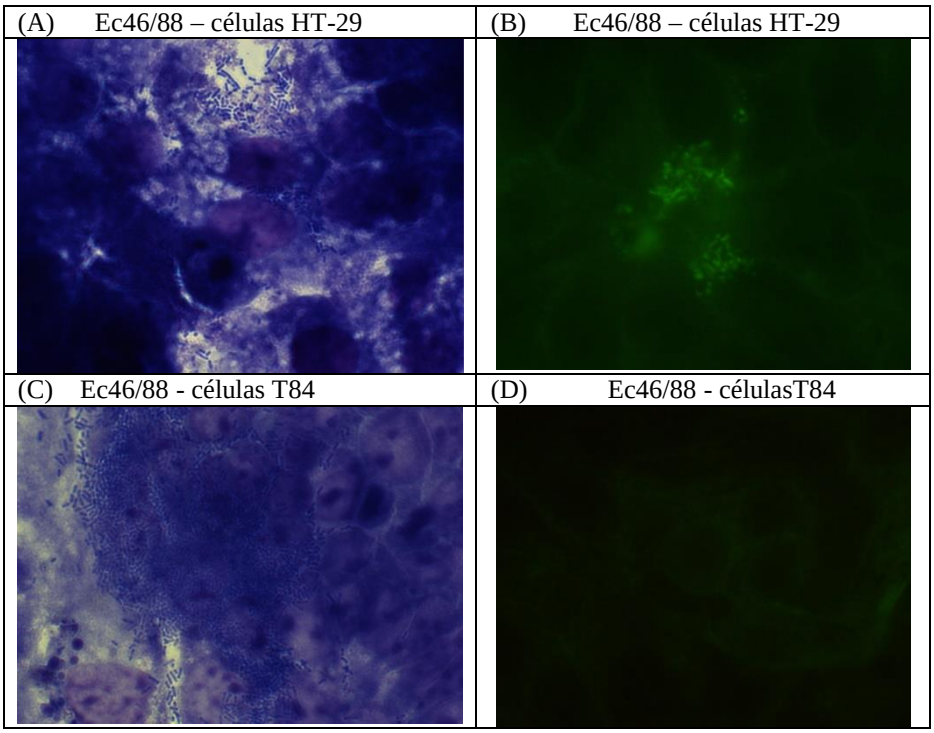
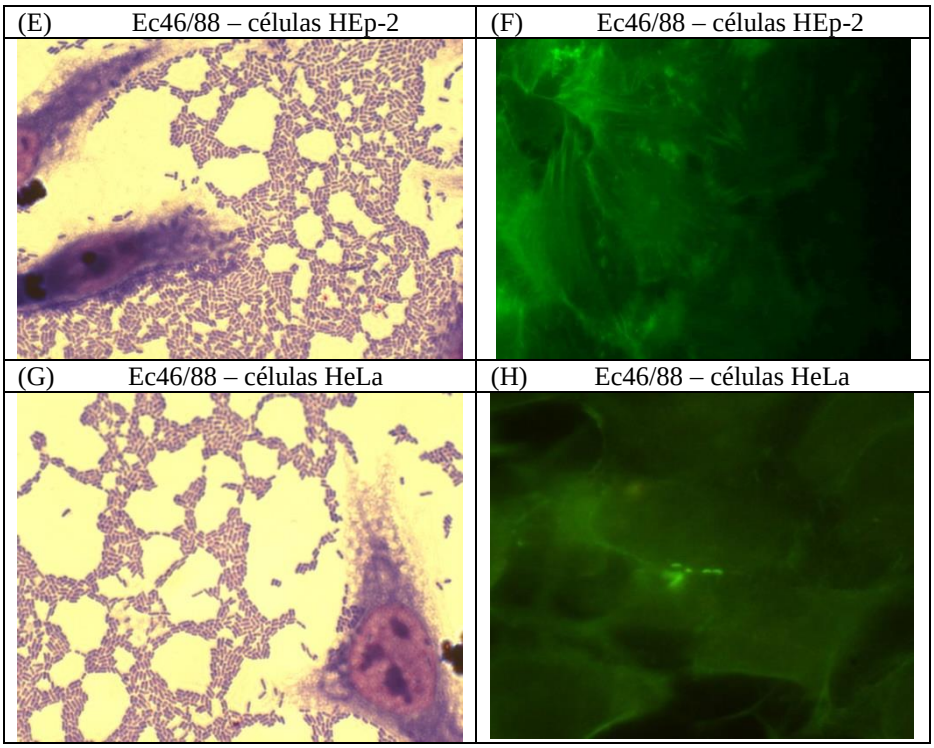


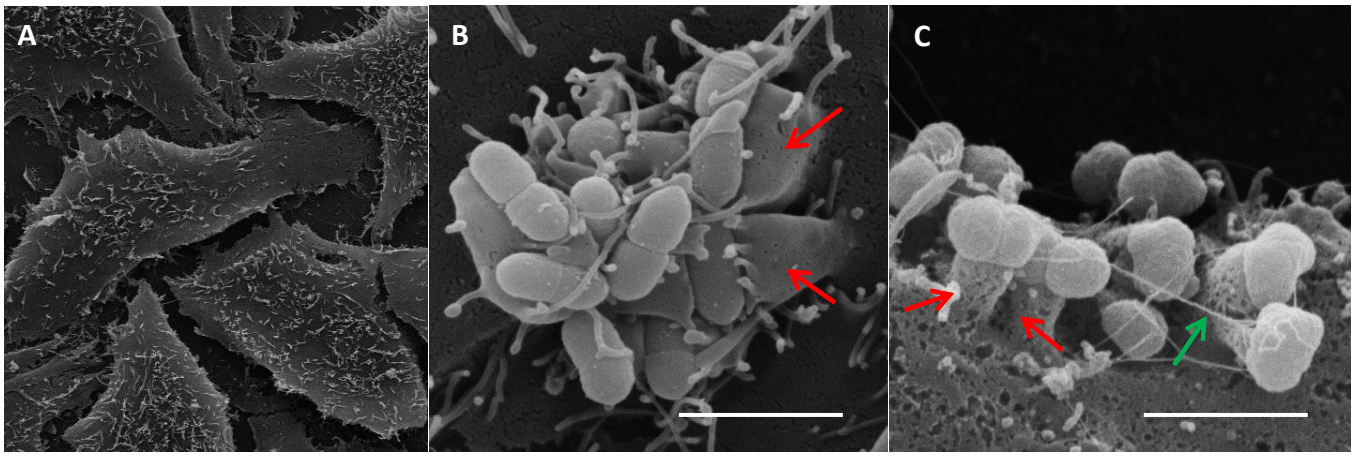
Figura 6 - Ensaios de adesão e FAS com a cepa Ec46/88 em diferentes linhagens celulares. (conclusão)



Ensaios de adesão e teste de FAS com a cepa Ec46/88 em células HT-29, T84, HEp-2 e HeLa após 6h de interação. **(A)** adesão agregativa em células HT-29; **(B)** teste de FAS em células HT-29; **(C)** adesão agregativa em células T84; **(D)** teste de FAS em células T84; **(E)** adesão agregativa em células HEp-2; **(F)** teste de FAS em células HEp-2; **(G)** adesão agregativa em células HeLa; **(H)** teste de FAS em células HeLa. Aumento: 1.000 vezes.

A MEV foi utilizada para análise da interação e adesão íntima da cepa Ec46/88 com monocamadas de células HeLa, linhagem em que o teste de FAS foi positivo. As células epiteliais HeLa foram infectadas com as cepas Ec46/88 (6h) e tEPEC E2348/69 (3h) e processadas para visualização em MEV. Pode-se observar na figura 7 a capacidade de adesão íntima da cepa Ec46/88 com a superfície das células HeLa, e subsequente formação de pedestal, característico da lesão A/E, também observado na interação com a tEPEC E2348/69. Nota-se no ensaio com a cepa Ec46/88 a presença de filamentos interligando as bactérias.

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura da interação da cepa Ec46/88 com células HeLa.



Fotomicrografias (MEV) de monocamadas de células HeLa infectadas com a cepa Ec46/88 demonstrando a capacidade da cepa em induzir a formação de pedestal. **(A)** células Hela não infectadas; **(B)** cepa protótipo tEPEC E2348/69 (controle de formação de pedestal); **(C)** cepa Ec46/88. As setas vermelhas indicam o local da formação do pedestal sob a adesão bacteriana e a seta verde evidencia estruturas filamentosas conectando as bactérias. Barras, 2 µm.

4.1.3 Pesquisa de marcadores de virulência de EAEC

De acordo com o apresentado na Tabela 11, não houve detecção dos genes que codificam as adesinas AAF/II (*aafA* e *aafC*), AAF/III (*agg3A* e *agg3B*), AAF/IV (*agg4A* e *agg4C*), Pil (*pilS* e *pilV*) e Ap58 (*ap58*); as toxinas EAST1 (*astA*) e Pet (*pet*); a mucinase Pic (*pic*); a proteína dispersina (*aap*); o sideróforo Irp (*irp2*); bem como dos genes do *cluster capU* (*shf-rfbU-virk*) e dos genes *aaiA* e *aaiC* (PAI *pheU*).

O fragmento sonda AA ou CVD432, correspondente ao gene *aatA*, foi amplificado com o tamanho esperado para o respectivo gene da EAEC 17-2 (630 pb), conforme mostrado na Figura 8.

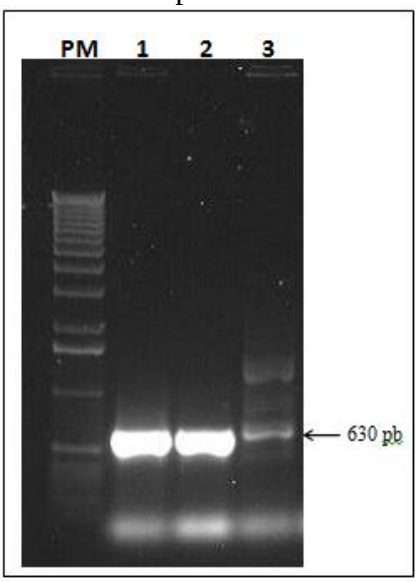
Na Figura 9 pode-se observar a detecção dos genes *aggB*, *aggC* e *aggD* do operon da fímbria AAF/I, amplificados com os tamanhos esperados para os mesmos genes da EAEC 17-2 (316 pb, 538 pb e 402 pb, respectivamente). Os genes *aggA* (que codifica a pilina) e *aggR* (regulador transcricional), que também parte desse operon, não foram detectados. Cabe salientar que os iniciadores utilizados na detecção dos genes *agg* foram baseados na sequência de nucleotídeos da EAEC 17-2 e que há relatos de variantes no gene *aggA* em outras cepas de EAEC (BHARDWAJ et al., 2006).

Tabela 11 - Detecção dos genes de virulência de EAEC na cepa Ec46/88.

Gene	Fragmento amplificado	Resultado
aggA	-	-
aggB	316 pb	+
aggC	538 pb	+
aggD	402 pb	+
aafA	-	-
aafC	-	-
agg3A	-	-
agg3C	-	-
agg4A	-	-
agg4C	-	-
aggR	-	-
pilS	-	-
pilV	-	-
ap58	-	-
aatA (sonda CVD432)	630 pb	+
astA	-	-
pic	-	-
pet	-	-
aap	-	-
shf	-	-
virK	-	-
rfbU	-	-
irp2	-	-
aaiA	-	-
aaiC	-	-

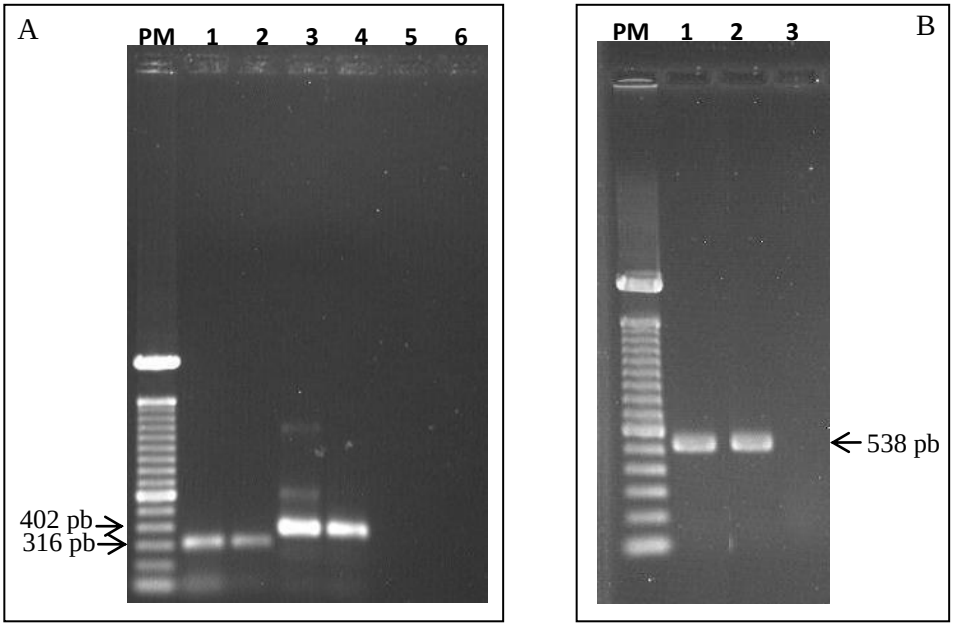
Resultados dos ensaios de detecção dos genes de virulência de EAEC na cepa Ec46/88. A tabela descreve os genes pesquisados, os tamanhos dos fragmentos amplificados e os resultados da pesquisa por PCR.

Figura 8 - Detecção do gene *aatA* na cepa Ec46/88.



Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do produto amplificado na PCR para detecção do gene *aatA* (630 pb). Canaletas: (PM) marcador de peso molecular 100 bp *ladder* (Invitrogen); (1) EAEC 17-2, controle positivo; (2) cepa Ec46/88; (3) *E. coli* DH5α, controle negativo. A seta indica o tamanho do produto amplificado.

Figura 9 - Detecção dos genes *aggB*, *aggD* e *aggC* na cepa Ec46/88.



Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos produtos amplificados nas PCRs para detecção dos genes *aggB* (316 pb), *aggD* (402 pb) e *aggC* (538 pb). **(A)** Detecção do gene *aggB* e *aggD*. Canaletas: (PM) marcador de peso molecular 100 bp *ladder* (Invitrogen); (1) EAEC 17-2, controle positivo para *aggB*; (2) amplificação de *aggB* na cepa Ec46/88; (3) EAEC 17-2, controle positivo para *aggD*; (4) amplificação de *aggD* na cepa Ec46/88; (5) cepa DH5α, controle negativo para *aggB*; (6) cepa DH5α, controle negativo para *aggD*. **(B)** Detecção do gene *aggC*. Canaletas: (PM) marcador de peso

molecular 100 bp *ladder* (Invitrogen); (1) amplificação de *aagC* na cepa Ec4688; (2) EAEC 17-2, controle positivo para *aggC*; (3) cepa DH5α, controle negativo para *aggC*. As setas indicam o tamanho dos produtos amplificados.

4.1.4 Pesquisa de adesinas fimbriais de *E. coli* patogênicas

A presença de vários genes que codificam subunidades estruturais de fímbrias descritas em aEPEC, EHEC, STEC DAEC ETEC e UPEC foi pesquisada na cepa deste estudo. Conforme mostrado na Tabela 12, não houve detecção dos genes que codificam a fímbrias P (*papA*) e S (*sfaA*) de UPEC; Lda (*ldaH*) de aEPEC; *Sorbitol-Fermenting pilus* (*sfpA*) de EHEC; AIDA-I (*aida*) e F1845 (*daaC*) de DAEC; e os fatores de colonização de ETEC fimbriais: CFA/I, CFA/III, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6 e CS21.

Dentre as variantes da fimbria Lpf (*long polar fimbriae*) de EHEC, houve apenas a detecção do gene *lpf*A_1 (A_1-A), o qual codifica a variante A1. Os genes *fim*A, *fim*H (fímbria tipo I) e *ecpA* (fimbria ECP) também foram detectados. Essas fímbrias são amplamente distribuídas em cepas de *E. coli* de vários patótipos. Todos esses genes foram amplificados com tamanhos semelhantes aos respectivos amplicons das cepas protótipo para cada gene, ou seja, 222 pb para *lpfA1*, 161 pb para *fimA*, 508 pb para *fimH* e 485 pb para *ecpA*.

Em resumo, além dos genes do operon da fímbria AAF/I (*aggDBC*), a cepa Ec46/88 alberga genes da fímbria tipo I, da variante A1 de Lpf e de ECP.

Tabela 12 - Detecção dos genes de adesinas fimbriais de patótipos de *E. coli* na cepa Ec46/88. (continuação)

Gene	Fragmento amplificado	Resultado
fimA	161 pb	+
fimH	508 pb	+
ecpA	485 pb	+
papA	-	-
sfaA	-	-
ldaH	-	-
sfpA	-	-
lpfA O113	-	-
lpfA1 (A1-A)	222 pb	+
lpfA1(A1-B1)	-	-

Tabela 12 - Detecção dos genes de adesinas fimbriais de patótipos de *E. coli* na cepa Ec46/88. (conclusão)

lpfA1 (A1-C)	-	-
lpfA1 (A1-C_F/ A1-$C1_R$)	-	-
lpfA2 (A2-B1)	-	-
aida-I	-	-
daaC	-	-
CS21/*lngA*	-	-
CFA/I	-	-
CFA/III	-	-
CS1	-	-
CS2	-	-
CS3	-	-
CS4	-	-
CS5	-	-
CS6	-	-

Resultados dos ensaios de detecção dos genes de adesinas fimbriais de vários patótipos de *E. coli* na cepa Ec46/88. A tabela descreve os genes pesquisados, os tamanhos dos fragmentos amplificados e os resultados da pesquisa por PCR.

4.1.5 Análise filogenética

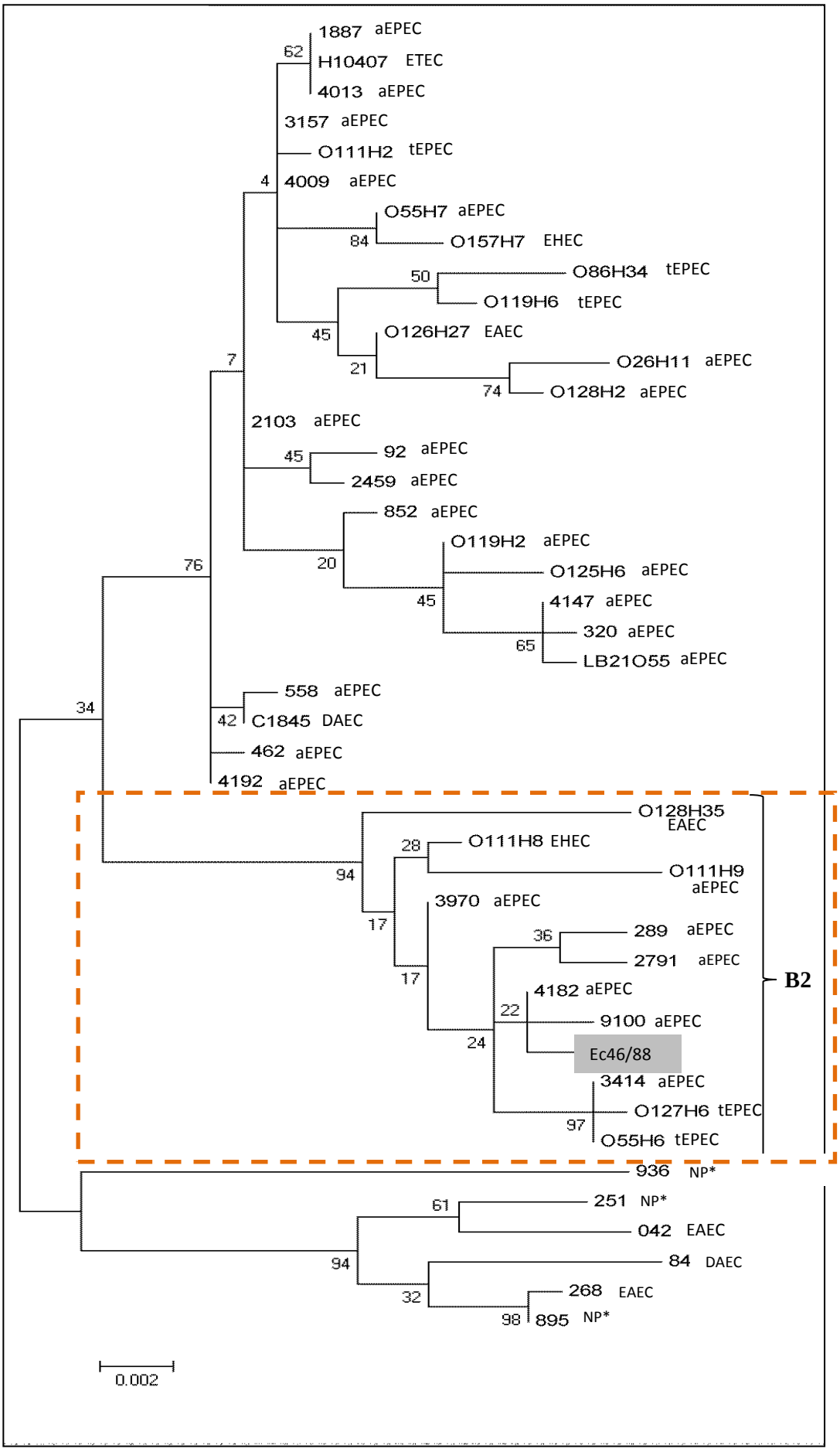
As sequências de nucleotídeos de alguns genes *housekeeping* da cepa Ec46/88 foram obtidas com a finalidade de analisar as relações filogenéticas dessa cepa com outros patótipos de *E. coli* diarreiogênicas. Esses dados foram analisados em conjunto com os resultados de sequenciamento dos mesmos genes de outras 43 cepas pertencentes a vários patótipos, obtidos anteriormente por Bando et al. (2009).

As sequências parciais dos genes *arcA* (664 pb), *mtlD* (1.282 pb) e *rpoS* (878 pb) obtidas foram alinhadas e analisadas. Em seguida foram concatenadas e exportados para o programa MEGA (versão 5.0.5) para a inferência da árvore filogenética juntamente aos dados de Bando et al. (2009). A distância genética entre as amostras foi obtida pelo método Kimura-2 parâmetros e o filograma foi construído através do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1000 réplicas.

A inserção dos dados da cepa Ec46/88A na árvore filogenética permitiu a sua localização no grupo filogenético B2, relacionado a outras aEPEC, conforme mostrado na

Figura 10. As cepas desse grupo mostraram-se geneticamente relacionadas com a cepa protótipo de tEPEC E2348/69 (sorotipo O127:H6). As cepas geneticamente mais relacionada à Ec46/88 incluíram as aEPEC dos sorotipos O119:H15, O119:H19, O125:H6, O55:H6 e ONT:H6. Além de duas tEPEC: uma O55:H6 e a protótipo E2348/69. Embora essa análise tenha sido realizada somente com três genes (*arcA*, *mtlD* e *rpoS*), o valor de *bootstrap* do grupo foi alto (94), indicando sua robustez.

Figura 10 - Árvore filogenética de 44 cepas de *E. coli* diarreiogênicas, *E. coli* não patogênicas e a cepa Ec46/88 deste estudo.



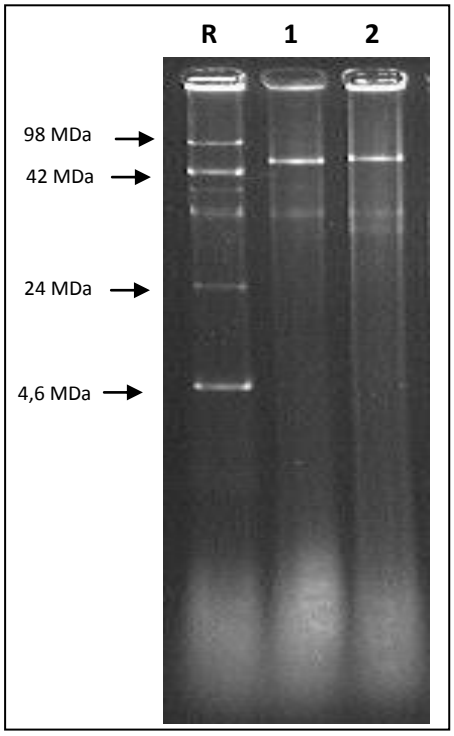
O filograma foi construído através do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas. A cepa Ec46/88 (O142:H34) está em destaque e pertence ao grupo filogenético B2. Sorotipos das cepas: 1887 (O111:H38), H10407 (O72:H11), 4013 (O88:H25), 3157 (O119:H2), 4009 (O114:H25), 2103 (O26:H11), 92 (O2:H16), 2459 (O26:H11), 852 (O88:H25), 4147 (O55:H7), 320 (O55:H7), 558 (O111:H40), C1845 (O75:HNM), 462 (O51:H40), 4192 (O111:H25), 3970 (O55:HNM), 289 (O119:H15), 2791 (O119:H19), 4182 (O125:H6), 9100 (O55:H6), 3414 (ONT:H6), 936 (O1:H45), 251 (O11:H10), 042 (O44:H18), 84 (O86:H11), 268 (O49:H6), 895 (O153:H19).
*NP, ausência de marcadores de virulência de *E. coli* diarreiogênicas.

4.1.6 Análise do perfil plasmideal e localização dos genes do operon *agg* na cepa Ec46/88

Os genes *aggBDC* detectados na cepa Ec46/88 foram descritos originalmente na EAEC 17-2, localizados em seu plasmídeo de virulência pAA1 (NATARO *et al*, 1992). Esse achado, juntamente à reatividade com a sonda *aatA*, levantou a hipótese de que a cepa Ec46/88 pudesse albergar um plasmídeo pAA. Para investigar a presença desse plasmídeo foram realizadas análises de perfil plasmideal e *Southern blot* com sondas para os genes *aatA* e do operon *agg*.

A cepa Ec46/88 apresentou apenas um plasmídeo de alta massa molecular (~ 60 MDa), muito semelhante ao da cepa protótipo EAEC 17-2 (Figura 11).

Figura 11 - Perfil plasmideal da cepa Ec46/88.



Eletroforese em gel de agarose (0,8%) das extrações plasmideais. Canaletas: (R) cepa *E. coli* R861, marcador de peso molecular plasmideal; (1) perfil plasmideal da cepa EAEC 17-2; (2) perfil plasmideal da cepa Ec46/88. As setas indicam as massas moleculares de referência na cepa *E. coli* R861.

A presença de um plasmídeo de massa molecular semelhante ao pAA1 da EAEC 17-2 sugeriu que a localização dos genes do operon *agg*, bem como do fragmento sonda *aatA*, fosse plasmideal na cepa Ec46/88.

Com a finalidade de verificar a presença dos genes *aggA*, *aggC*, *aggR* e *aatA* no plasmídeo presente na cepa protótipo deste estudo, foram realizadas reações de hibridização do plasmídeo com sondas genéticas específicas. Os resultados dessas hibridizações estão apresentados nas Figuras 12 e 13. Pode-se observar que houve reatividade do plasmídeo da cepa Ec46/88 com as sondas referentes aos genes *aagA*, *aggC* e *aatA*, da mesma forma que com o pAA1 presente na EAEC 17-2. Como inicialmente o gene *aggA* não foi amplificado pela PCR, a detecção desse gene por meio de hibridização indicou que a cepa Ec46/88 apresentava uma variante do gene *aggA*, não detectada com iniciadores baseados na sequência do mesmo gene da EAEC 17-2.

Figura 12 – *Southern blot* utilizando os genes *aggA*, *aggC* e *aggR* como sondas genéticas.

(continuação)

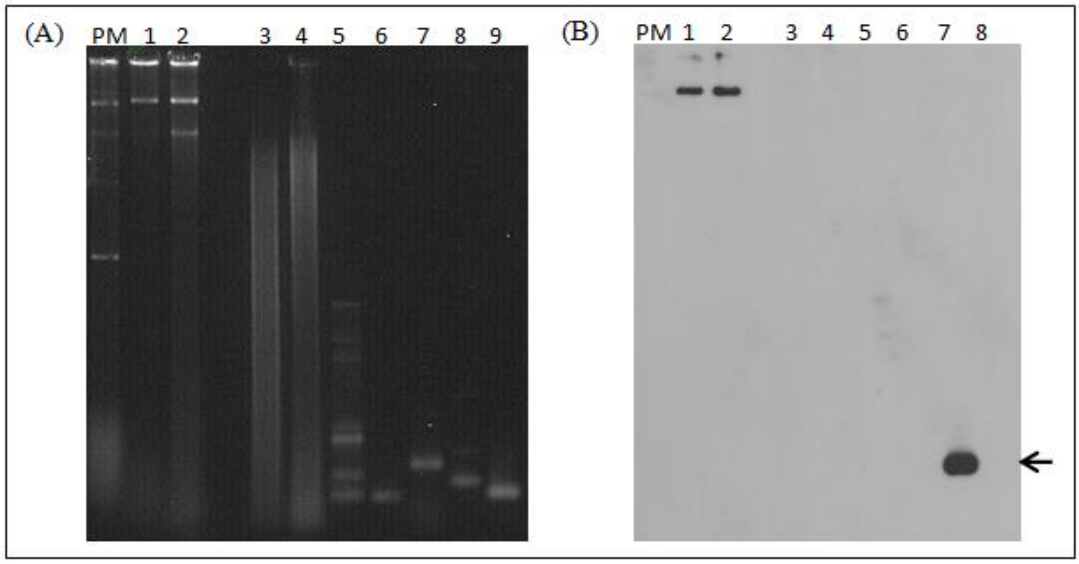
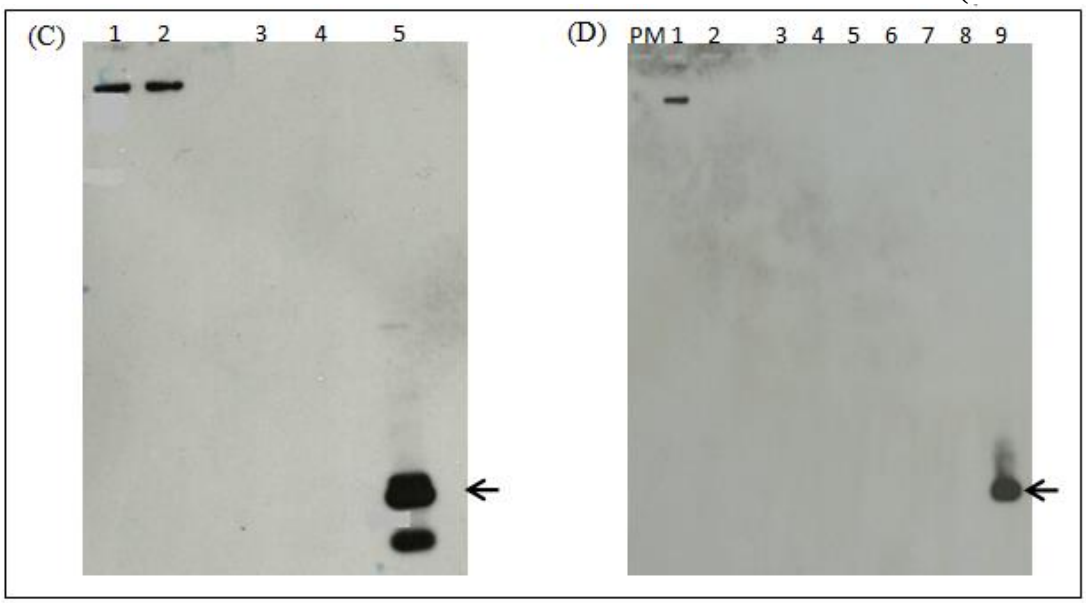


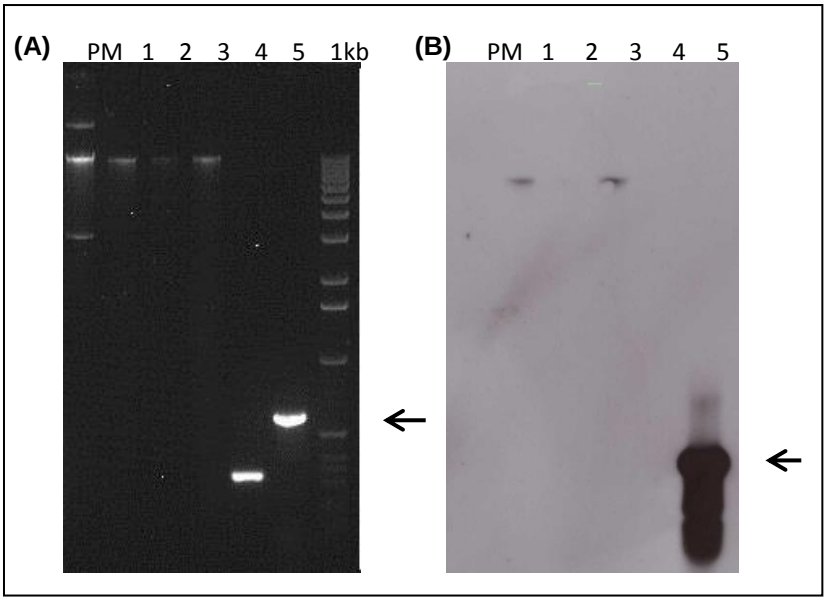
Figura 12 – *Southern blot* utilizando os genes *aggA*, *aggC* e *aggR* como sondas genéticas.

(conclusão)



A figura mostra a reatividade dos conteúdos plasmideais com as sondas *aggA*, *aggC* e *aggR*. Membranas de *nylon* contendo os plasmídeos imobilizados foram hibridizadas com as sonda *aggA* (450 pb), *aggC* (538 pb) e *aggR* (308 pb) marcadas por quimioluminescência e expostas a filmes de raio-X. A detecção de sinal revelado no filme de raio-X indica reatividade com a sonda. **(A)** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de extrações plasmideais, genômicas e produtos de PCR. Canaletas: (PM) extração plasmideal da *E. coli* R861; (1) extração plasmideal da EAEC 17-2; (2) extração plasmideal da cepa Ec46/88; (3) extração genômica da EAEC 17-2; (4) extração genômica da cepa Ec46/88; (5) fragmento amplificado referente ao gene *aggA* da EAEC 17-2*;* (6) fragmento amplificado referente ao gene *aggB* da EAEC 17-2; (7) fragmento amplificado referente ao gene *aggC* da EAEC 17-2; (8) fragmento amplificado referente ao gene *aggD* da EAEC 17-2; (9) fragmento amplificado referente ao gene *aggR* da EAEC 17-2. **(B)** Hibridização com a sonda *aggA*. Detecção de sinal nas canaletas: (1) plasmídeo da EAEC 17-2; (2) plasmídeo da cepa Ec46/88; (5) amplicon *aggA* da EAEC 17-2. **(C)** Hibridização com a sonda *aggC*. Detecção de sinal nas canaletas: (1) plasmídeo da EAEC 17-2; (2) plasmídeo da cepa Ec46/88; (7) amplicon *aggC* da EAEC 17-2. **(D)** Hibridização com a sonda *aggR*. Detecção de sinal nas canaletas: (1) plasmídeo da EAEC 17-2; (2) plasmídeo da cepa Ec46/88; (9) amplicon *aggR* da EAEC 17-2.

Figura 13 – *Southern blot* utilizando o gene *aatA* como sonda genética.



A figura mostra a reatividade dos conteúdos plasmideais com a sonda *aatA*. Uma membrana de *nylon* contendo os plasmídeos imobilizados foi hibridizada com a sonda *aatA* (630 pb) marcada por quimioluminescência e exposta a um filme de raio-X. A detecção de sinal revelado no filme de raio-X indica reatividade com a sonda. **(A)** eletroforese em gel de agarose (0,8%) de extrações plasmideais e produtos de PCR. Canaletas: (PM) extração plasmideal da *E. coli* R861; (1) extração plasmideal da cepa 17-2; (2) extração plasmideal da cepa 042; (3) extração plasmideal da cepa Ec46/88; (4) fragmento amplificado referente ao gene *aggR* da EAEC 17-2*;* (5) fragmento amplificado referente ao gene *aatA* da EAEC 17-2. **(B)** Hibridização com a sonda *aatA*. Detecção de sinal nas canaletas: (1) plasmídeo da EAEC 17-2; (2) plasmídeo da EAEC 042; (3) plasmídeo da cepa Ec46/88; (5) amplicon *aatA* da EAEC 17-2.

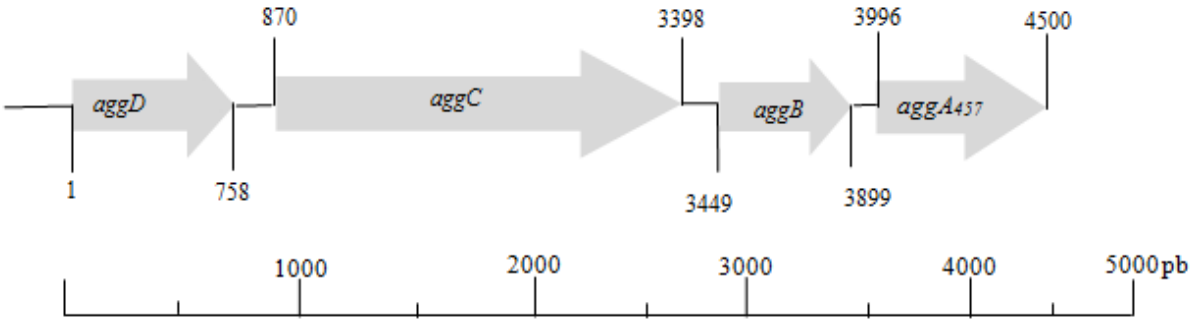
4.2 Sequenciamento dos genes que compõem o operon *aggDCBA* da cepa Ec46/88

A estratégia de sequenciamento do operon *agg* baseou-se na amplificação por PCR de diversos fragmentos com auxílio de iniciadores baseados na sequência dos mesmos genes da EAEC 17-2 (número de acesso no GenBank: U12894.1). Esses fragmentos cobriram todo o operon, apresentando regiões de sobreposição, a fim de permitir a montagem de uma sequência contínua (Figura 4).

Os diversos fragmentos foram sequenciados em ambos os sentidos e as diversas sequências obtidas foram alinhadas em um único *contig* correspondente a 4,5 kb. Essa região sequenciada compreende quatro *open reading frames* (ORF) organizadas na mesma sequência e orientação dos genes *agg* da EAEC 17-2 (número de acesso no GenBank: U12894.1).

Conforme apresentado na Figura 14, a primeira ORF apresentou 758 pb e a análise através do programa BLAST mostrou uma identidade de 97% com o gene *aggD*, que codifica a proteína chaperonina da biogênese da fímbria AAF/I da EAEC 17-2 (GenBank: U12894.1). A segunda ORF apresentou 451 pb e identidade de 98% com o gene *aggB*, que codifica uma proteína críptica não essencial para a biogênese da fímbria AAF/I (GenBank: U12894.1). A terceira ORF apresentou 2.529 pb e identidade de 98% com o gene *aggC*, que codifica uma proteína com funções de *usher* da fímbria AAF/I (GenBank: U12894.1). A última ORF apresentou 505 pb e identidade de 99% com o gene $aggA_{457}$ (número de acesso no GenBank: Y18149) da cepa de EAEC 457 (sorogrupo O126), o qual codifica uma subunidade estrutural de AAF/I (pilina) variante. As regiões intergênicas representaram 112, 51 e 97 pb e não correspondem a ORFs.

Figura 14 – Esquema dos genes do operon *agg* sequenciados da cepa Ec46/88.



O esquema acima representa a organização (5´-3´) do operon *agg* da cepa Ec46/88, onde as barras indicam o início e o término de cada gene sequenciado. Nucleotídeo 1 ao 758: *aggD* (758 pb); Nucleotídeo 870 ao 3.398: *aggC* (2.529 pb); Nucleotídeo 3.449 ao 3.899: *aggB* (451 pb); Nucleotídeo 3.996 ao 4.500: *aggA* (505 pb).

4.3 Sequenciamentos dos genes que compõem o operon *ecp* da cepa Ec46/88

A estratégia de sequenciamento do operon *ecp* baseou-se na amplificação por PCR de diversos fragmentos com auxílio de iniciadores baseados na sequência dos mesmos genes da tEPEC E2348/69 (número de acesso no GenBank: NC_011601.1). Esses fragmentos cobriram

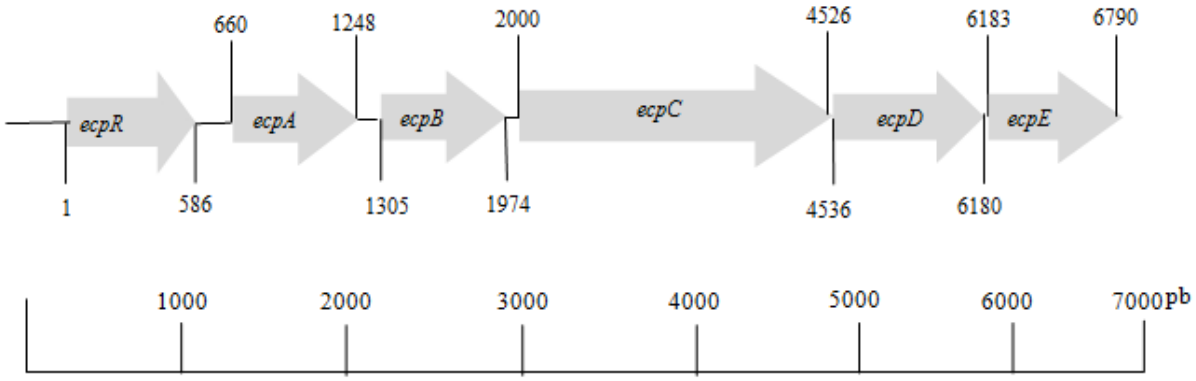
todo o operon, apresentando regiões de sobreposição a fim de permitir a montagem de uma sequência contínua (Figura 5).

Os diversos fragmentos foram sequenciados em ambos os sentidos e as diversas sequências obtidas foram alinhadas em um único *contig*, correspondente a 6,8 kb. Essa região sequenciada compreende seis ORFs organizadas na mesma sequência e orientação dos genes *ecp* da tEPEC E2348/69 (número de acesso no GenBank: NC_011601.1).

Na cepa E2348/69 de tEPEC o operon *ecp* é composto por seis genes: *ecpR* (586 pb), que codifica o regulador desse operon; *ecpA* (588 pb), que codifica a pilina da fímbria ECP; *ecpB* (669 pb), que codifica para uma chaperona; *ecpC* (2.526 pb), proteína *usher*; *ecpD* (1.644 pb), que codifica a estrutura terminal da adesina; *ecpE* (756 pb), que codifica para outra proteína chaperona acessória (número de acesso no GenBank: NC_011601.1).

Conforme mostrado na Figura 15, as seis ORFs identificadas no fragmento sequenciado do genoma da cepa Ec46/88 apresentaram os mesmos tamanhos (pb) dos genes do operon *ecp* da tEPEC E2348/69. A análise através do programa BLAST mostrou identidades entre 98 e 99% com os respectivos genes da tEPEC E2348/69 (número de acesso no GenBank: NC_011601.1).

Figura 15 - Esquema dos genes do operon *ecp* sequenciados da cepa Ec46/88.



O esquema acima representa a organização (5´-3´) do operon *ecp* da cepa Ec46/88, onde as barras representam o início e o término de cada gene sequenciado. Nucleotídeo 1 ao 586: *ecpR* (586 pb); Nucleotídeo 660 ao 1.248: *ecpA* (589 pb); Nucleotídeo 1.305 ao 1.974: *ecpB* (670 pb); Nucleotídeo 2.000 ao 4.526: *ecpC* (2.527 pb); Nucleotídeo 4.536 ao 6.180: *ecpD* (1.645 pb); Nucleotídeo 6.183 ao 6.790: *ecpE* (608 pb).

4.4 Papel das fímbrias AAF/I e ECP na adesão agregativa da cepa Ec46/88

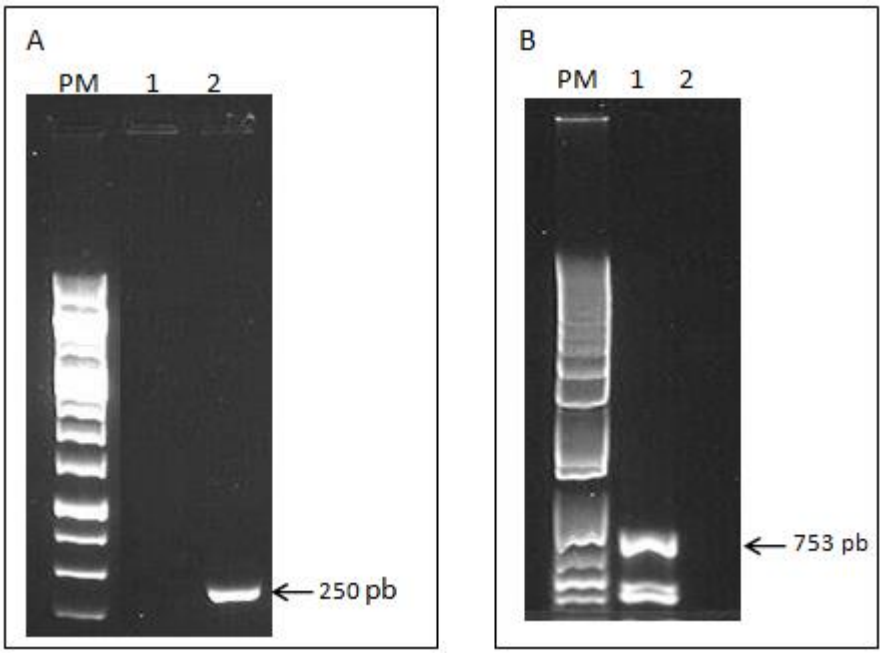
4.4.1 Obtenção dos mutantes Ec46/88ΔaggC e Ec46/88ΔecpC

Com o intuito de verificar a participação das fímbrias AAF/I e ECP no fenótipo de adesão da cepa Ec46/88 foram realizadas mutações com a deleção dos genes *aggC* e *ecpC*, os quais codificam as proteínas *usher* dos respectivos sistemas. A delação desses componentes previne a montagem das fimbrias abolindo completamente a presença das mesmas, uma vez que esse tipo de mutação é polar.

Com a utilização de técnicas de recombinação homóloga sítio-dirigida, empregando as recombinases do fago lambda, sistema RED de recombinação, os dois genes acima mencionados foram deletados e suas sequências foram substituídas por cassetes de resistência ao cloranfenicol (cloranfenicol acetiltransferase, *cat*), utilizados como marcadores de seleção do sucesso da recombinação. Após a seleção das cepas mutantes apresentando resistência ao cloranfenicol, a confirmação da correta mutação foi realizada por PCR e sequenciamento de DNA.

No caso da deleção do gene *aggC* foi realizada a amplificação de um fragmento que engloba parte da sequência nativa que flanqueia o gene deletado e parte do cassete de cloranfenicol com a utilização dos iniciadores CmDT-F e AAF4'-R, amplificando um fragmento de 250 pb (Figura 16A). No caso da deleção do gene *ecpC* foi realizada a amplificação de um fragmento que engloba parte da sequência nativa que flanqueia o gene deletado e parte do cassete de cloranfenicol com a utilização dos iniciadores CmDT-F e ecpD-R amplificando um fragmento de 753 pb (Figura 16B).

Figura 16 – Detecção do gene de resistência ao cloranfenicol nos mutantes Ec46/88Δ*aggC* e Ec46/88Δ*ecpC*.



Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos produtos amplificados nas PCRs correspondentes aos genes *aggC* e *ecpC* deletados. **(A)** Amplificação com o iniciador *forward* do cassete de resistência ao cloranfenicol (CmDT-F) e o *reverse* AAF-4'. Canaletas: (PM): *1 kb GeneRuler* (Thermo scientific); (1) cepa selvagem Ec46/88; (2) cepa mutante Ec46/88Δ*aggC*. **(B)** Amplificação utilizando o iniciador *foward* CmDT e o iniciador *reverse ecpD*. Canaletas: (PM) *1 kb GeneRuler* (Thermo Scientific); (1) cepa mutante Ec46/88Δ*ecpC*; (2) cepa selvagem Ec46/88. As setas indicam os tamanhos dos fragmentos amplificados nas reações de PCR.

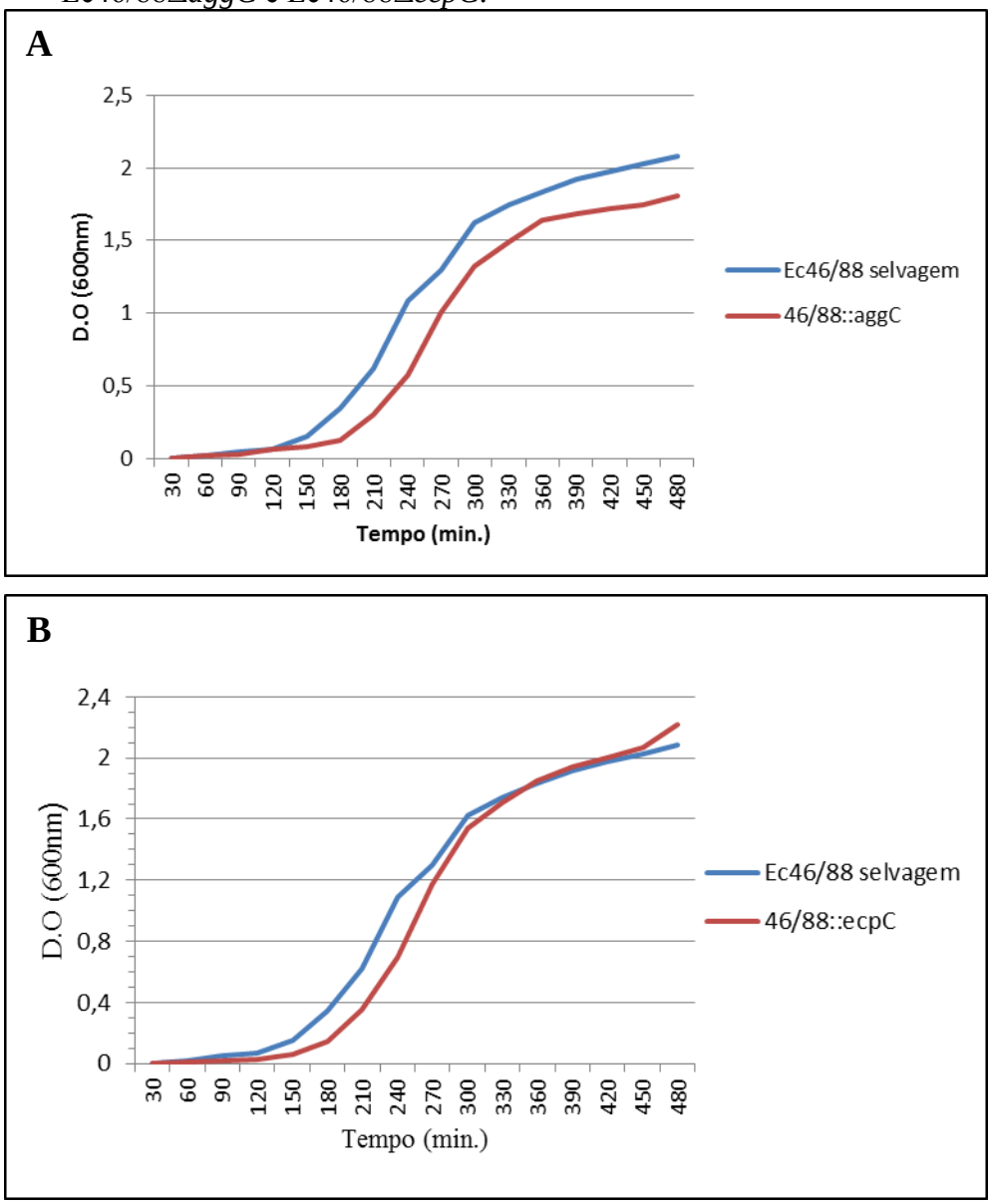
Essas amplificações indicaram a correta inserção do gene *cat* em *aggC* e *ecpC* tendo em vista a ocorrência de anelamento dos iniciadores *forward* baseados na sequência de *cat* e *reverse* baseados nas regiões que flanqueiam os genes que foram mutados. Mesmo assim, esses fragmentos amplificados foram posteriormente sequenciados. Os sequenciamentos de ambos os amplicons (Δ*aggC* e Δ*ecpC*) demonstraram a inserção do cassete de cloranfenicol na região 5´ e análises através do programa BLAST mostraram 98% de identidade do início da sequência com o gene *cat* do plasmideo pKD3 utilizado para inserção do cassete de resistência (número de acesso no GenBank: AY048742.1).

4.4.2 Análises fenotípicas dos mutantes Ec46/88Δ*aggC* e Ec46/88Δ*ecpC*

Inicialmente os mutantes obtidos foram avaliados quanto à curva de crescimento para verificar se as mutações não haviam interferido em suas características de replicação. A

Figura 17 mostra as curvas de crescimento da cepa selvagem Ec46/88 em relação às cepas mutantes Ec46/88Δ*aggC* e Ec46/88Δ*ecpC*. Pode-se observar que as mutações não interferiram significativamente no tempo de geração de ambos os mutantes.

Figura 17 – Curvas de crescimento da cepa Ec46/88 em comparação com cepas mutantes Ec46/88Δ*aggC* e Ec46/88Δ*ecpC*.

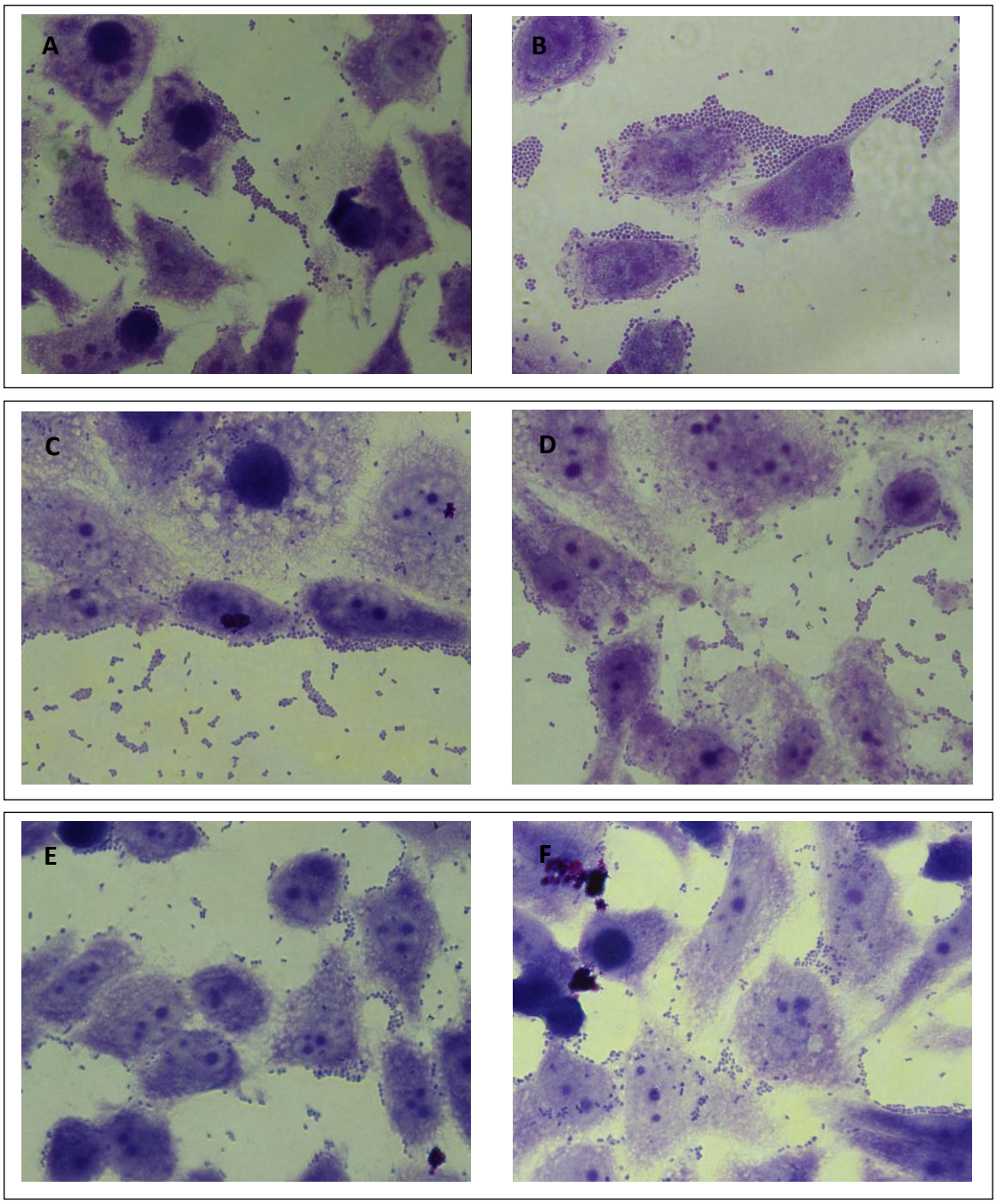


Curvas de crescimento da cepa Ec46/88 selvagem e dos mutantes Ec46/88Δ*aggC* (A) e Ec46/88Δ*ecpC* (B). As cepas foram cultivadas em caldo LB sob agitação constante de 300 rpm a 37 ºC. As absorbâncias dos cultivos das cepas em comprimento de onda de 600 nm foram obtidas em intervalos de 30 min durante 8 h.

Em seguida, o efeito da mutação nos genes de biogênese das fimbrias AAF/I e ECP foi avaliado na cepa Ec46/88 quanto à capacidade de aderência em células HeLa. Primeiramente

realizou-se o teste qualitativo em células HeLa com de 6h de interação, o qual pode ser visualizado na Figura 18. Foi evidenciada uma pequena redução da quantidade de bactérias aderidas nos ensaios com os mutantes Ec46/88Δ*ecpC* e Ec46/88Δ*ecpC*, em comparação com a cepa Ec46/88. Entretanto, o padrão AA apresentado pela cepa Ec46/88 continuou sendo expresso por ambos os mutantes.

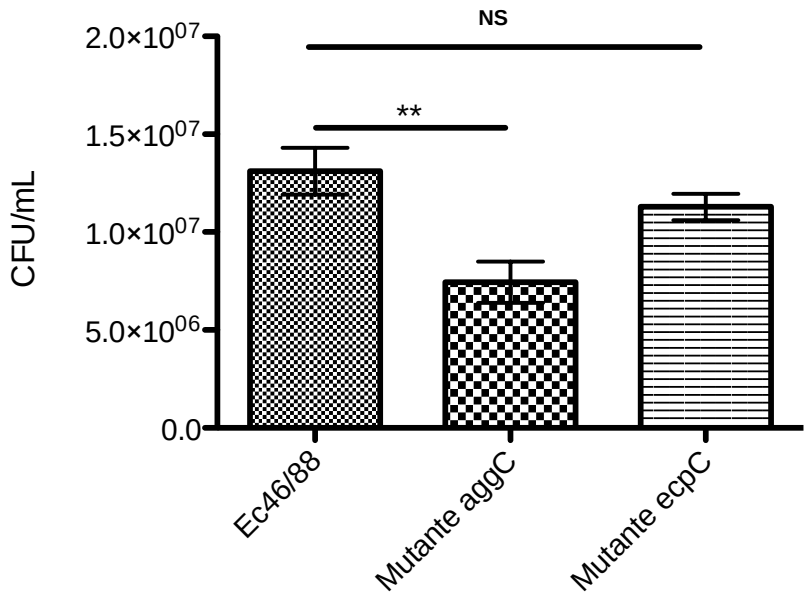
Figura 18 - Ensaios de adesão em células HeLa da cepa Ec46/88 e seus mutantes Ec46/88Δ*ecpC* e Ec46/88Δ*ecpC*.



Ensaios de adesão com a cepa Ec46/88 e seus mutantes em células HeLa após 6h de interação. **(A e B)** adesão agregativa da cepa Ec46/88; **(C e D)** adesão da cepa mutante Ec46/88Δ*aggC*; **(E e F)** adesão da cepa mutante Ec46/88Δ*ecpC*. Aumento: 1.000 vezes.

Uma vez que os ensaios qualitativos sugeriram uma pequena redução na quantidade de bactérias aderidas, embora sem alteração no padrão de adesão, partiu-se para a quantificação da adesão de ambos os mutantes. Os testes foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas e o resultado final foi obtido pela média de todos os valores de UFC/ml obtidos nesses experimentos. Conforme apresentado na Figura 19, houve uma pequena redução do índice de adesão da cepa mutante Ec46/88Δ*ecpC*, embora sem diferença estatística com a adesão apresentada pela cepa selvagem. Com relação ao mutante Ec46/88Δ*aggC*, o índice de adesão também foi menor, porém estatisticamente significante quando comparado com a adesão apresentada pela cepa selvagem.

Figura 19 – Gráfico dos valores da quantificação dos ensaios de adesão em células HeLa da cepa Ec46/88 e seus mutantes Ec46/88Δ*ecpC* e Ec46/88Δ*ecpC*.

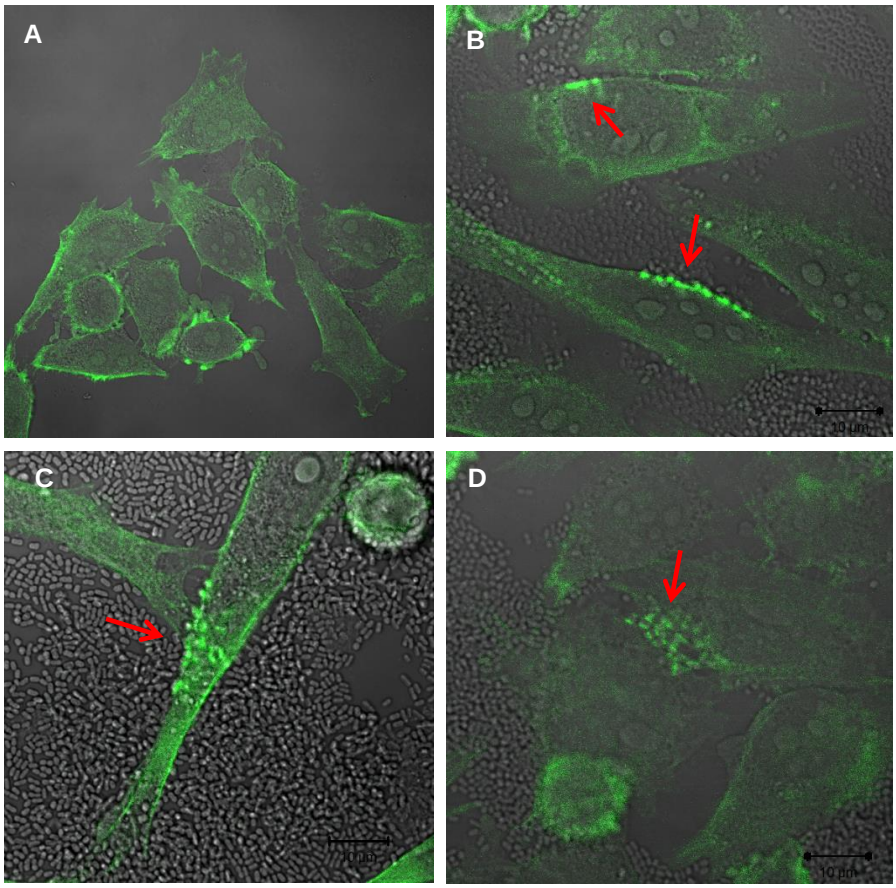


O gráfico de barras representa os valores em unidades formadoras de colônias (UFC)/ml obtidos nos testes de quantificação da adesão. A cepa selvagem Ec46/88 em comparação com os respectivos mutantes em Δ*aggC* e Δ*ecpC*. Pode-se observar que na cepa mutante Ec46/88Δ*aggC* houve uma redução estatisticamente significativa (**) em comparação com a cepa selvagem. Já os valores obtidos

para a cepa mutante Ec46/88Δ*ecpC* não foram estatisticamente significativos (NS). As barras representam o desvio-padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata.
** p = 0,0026 (P significativo < 0,05).

Os mutantes Ec46/88Δ*ecpC* e Ec46/88Δ*ecpC* também foram analisados quanto à capacidade de induzir a formação de pedestal, característica observada na cepa Ec46/88 em células HeLa. Para isso foram realizados testes de FAS com os mutantes, nos quais foi possível observar que a capacidade de induzir essa alteração histopatológica foi mantida em ambos (Figura 20).

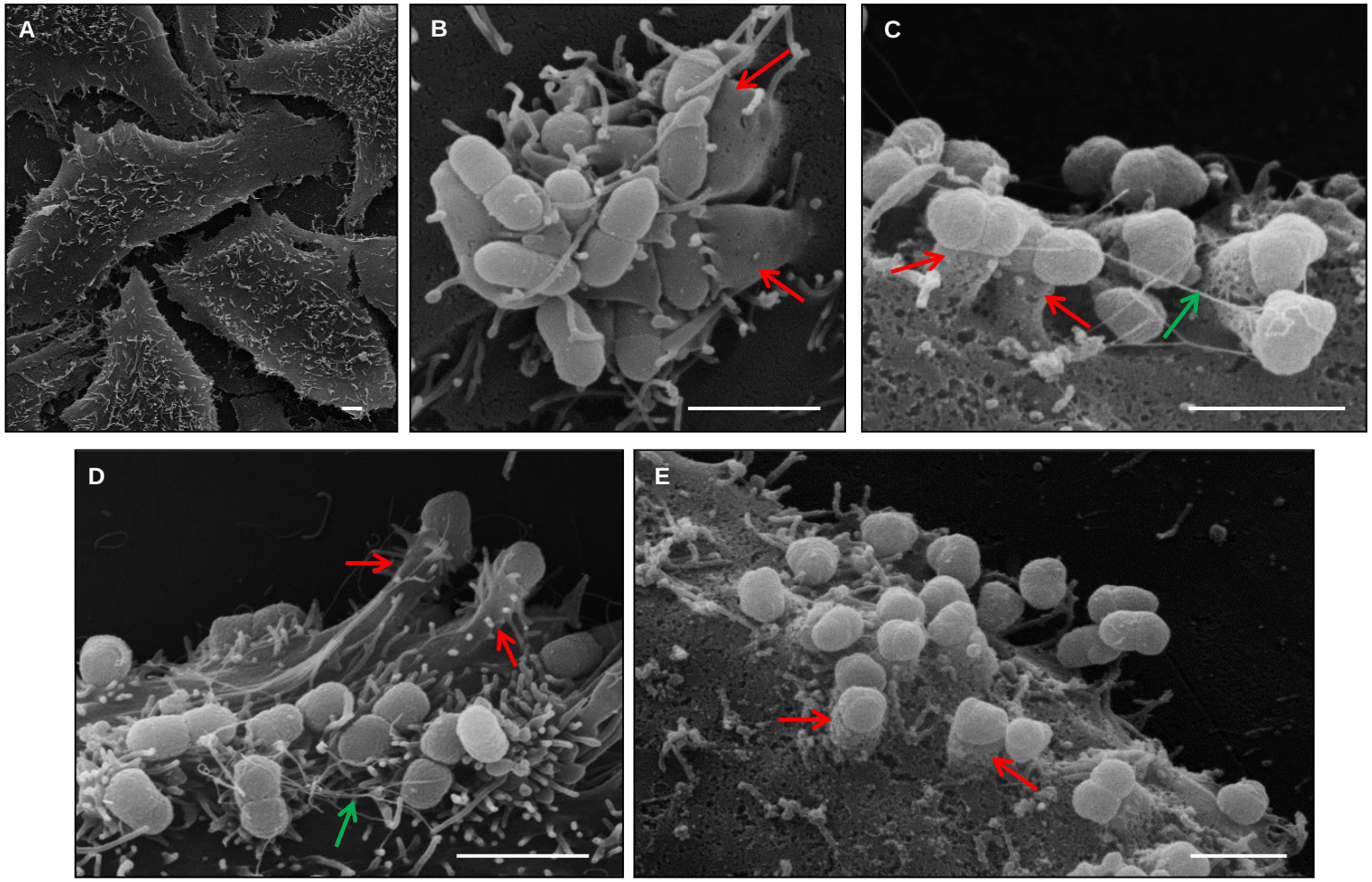
Figura 20 – Ensaios de FAS em células HeLa da cepa Ec46/88 e seus mutantes Ec46/88Δ*ecpC* e Ec46/88Δ*ecpC*.



Ensaios de FAS com a cepa Ec46/88 em células HeLa após 6h de interação. (A) células HeLa sem bactérias; (B) cepa Ec46/88; (C) cepa Ec46/88Δ*aggC;* (D) cepa Ec46/88Δ*ecpC*. As setas indicam o acúmulo de actina no local da adesão bacteriana. Visualização em microscopia confocal com aumento de 64 vezes.

A MEV também foi utilizada para análise da interação dos mutantes com monocamadas de células HeLa. As células epiteliais HeLa foram infectadas com as cepas Ec46/88, Ec46/88Δ*aggC*, Ec46/88Δ*ecpC* e processadas para visualização por MEV. Pode-se observar na figura 21 que a capacidade apresentada pela cepa Ec46/88 de aderir e induzir a formação de pedestal manteve-se em ambos os mutantes. Nota-se também que os filamentos interligando as bactérias, presentes nas cepas Ec46/88 e Ec46/88Δ*aggC*, estão ausentes no mutante Ec46/88Δ*ecpC*.

Figura 21 – Microscopia eletrônica de varredura da interação das cepas Ec46/88, Ec46/88Δ*aggC* e Ec46/88Δ*ecpC* com células HeLa.



Fotomicrografias (MEV) de monocamadas de células HeLa infectadas com a cepa Ec46/88 e seus mutantes demonstrando a capacidade das cepas em induzir a formação de pedestal (A) células Hela não infectadas; (B) cepa protótipo tEPEC E2348/69 (controle de formação de pedestal); (C) cepa Ec46/88; (D) cepa Ec46/88Δ*aggC*; (E) cepa Ec46/88Δ*ecpC*. As setas vermelhas indicam o local da formação do pedestal sob a adesão bacteriana e as setas em verde evidenciam estruturas filamentosas conectando as bactérias na cepa selvagem e no mutante Ec46/88Δ*aggC*. Barras, 2 µm.

5 DISCUSSÃO

A cepa Ec46/88 analisada no presente estudo pertence ao sorotipo O142:H34, foi isolada de um caso de diarreia aguda na cidade de São Paulo e previamente caracterizada como apresentando o genótipo *eae*$^{+}$/*bfpA*$^{-}$/EAF^{-}/*stx*$^{-}$ e expressando o padrão AA em células HeLa (GUILARDI et al., 2003). Embora pertença a um dos sorotipos clássicos de tEPEC (TRABULSI; KELLER, GOMES, 2002), essa cepa foi classificada como aEPEC pois não reagiu com as sondas para detecção de EAF e *bfpA*, características de aEPEC (HERNANDES et al., 2009).

A inusitada combinação de genes de virulência de EPEC e EAEC apresentada pela cepa Ec46/88, principalmente a reatividade com a sonda AA (*aatA*), originou as principais questões do presente estudo: caracterizar o padrão AA e avaliar a classificação dessa cepa como EPEC ou EAEC.

A primeira etapa deste estudo correspondeu à análise de características de EPEC no sentido de complementar os dados de Ghilardi et al. (2003), principalmente na questão da funcionalidade da região LEE. Os genes que codificam as proteínas responsáveis pelo estabelecimento da lesão A/E, característica da patogenicidade de EPEC, estão localizados em LEE (McDANIEL et al., 1995).

Na cepa Ec46/88 houve a detecção de *eae*, *espB* e *tir*. O fragmento amplificado do gene *eae* foi sequenciado e sua análise mostrou identidade de 99% com a porção conservada da intimina de várias linhagens de EPEC (dados não apresentados). Os genes *espA* e *espD*, os quais não foram detectados, apresentam grande diversidade com relação às sequências de nucleotídeos (CHINA et al., 1999; MAIRENA et al., 2004) e a falta de amplificação desses genes justifica-se pelo fato de que os iniciadores utilizados foram baseados na sequência de nucleotídeos da tEPEC E2348/69. Análises por *immunoblotting* de proteínas secretadas da região LEE da Ec46/88 evidenciaram a produção de EspA e EspD, entretanto com massa moleculares distintas em comparação com as mesmas proteínas secretadas pela tEPEC E2348/69 (dados não apresentados). Existe polimorfismo entre os filamentos de EspA, inclusive em cepas do sorotipo O142:H34 (NEVES et al., 2003).

EspA é uma das proteínas secretadas pelo aparato de secreção do tipo III, e interage com a célula hospedeira durante os primeiros estágios da formação da lesão A/E formando um canal pelo qual as proteínas efetoras são transportadas. EspB e EspD são proteínas

translocadoras adicionais e formam o poro na membrana da célula hospedeira, através do qual outras proteínas são translocadas para a célula eucariótica. Enquanto BFP parece ser o fator predominante requerido para a adesão inicial das tEPEC (CLEARLY et al., 2004), os filamentos EspA participam da adesão inicial às microvilosidades; contudo, de uma maneira menos eficiente, mediando a adesão na ausência de BFP. Este seria um dos possíveis mecanismos de adesão apresentados pela cepa do presente estudo.

O teste de FAS também foi realizado para avaliar a capacidade de polimerização da actina e, consequente, formação da lesão A/E. Esses experimentos mostraram que a cepa Ec46/88 apresenta essa capacidade, o que demonstra a funcionalidade dos genes da região LEE. Cabe salientar que essa capacidade foi dependente da linhagem celular, já que o resultado foi positivo somente nas células HeLa e HT-29. A capacidade de causar a lesão A/E por cepas de aEPEC que aderem no padrão AA já foi relatada anteriormente, bem como a dependência desse fenótipo com relação às linhagens celulares empregadas (ABE et al., 2009; BARROS et al., 2008; MOREIRA et al., 2008; ROCHA et al., 2011). No processo de formação do pedestal a possibilidade de sinalizações por parte da célula epitelial, bem como a presença de receptores específicos, não pode ser descartada. Isto explicaria os resultados negativos de FAS com as células HEp-2 e T84.

Uma vez comprovada a funcionalidade da região LEE e capacidade de causar a lesão A/E pela cepa Ec46/88, a segunda etapa deste estudo foi direcionada para o estudo do padrão AA apresentado em células HeLa (GHILARDI et al., 2003).

O padrão de adesão agregativo da cepa Ec46/88 foi avaliado em outras linhagens celulares epiteliais (intestinais e não intestinais), mostrando a sua reprodutibilidade. Resultados semelhantes foram descritos por Barros et al. (2008) com cepas de aEPEC do sorotipo O125:H6 que também apresentam o padrão AA. No patótipo EAEC o padrão AA é reprodutível em diferentes linhagens epiteliais cultivadas, bem como em biópsia de intestino humano (HICKS et al., 1996; NATARO et al., 1996).

Além da capacidade de aderir no padrão AA em distintas linhagens epiteliais, a cepa Ec46/88 reagiu com a sonda CVD432 (*aatA*) usada para o diagnóstico do patótipo EAEC (GHILARDI et al., 2003). Esses resultados indicavam a possibilidade da presença do plasmídeo de virulência de EAEC (pAA), uma vez que o gene *aatA* localiza-se no plasmídeo pAA1 e pAA2 nas EAEC 17-2 e 042, respectivamente (ELIAS et al., 1999; SAVARINO et al., 1994).

A cepa Ec46/88 foi então analisada quanto à presença de diversos fatores de virulência de EAEC, plasmideais e cromossômicos, com exceção de genes que codificam fímbrias, os quais foram analisados numa segunda etapa.

Com exceção de *aatA*, previamente detectado (GHILARDI et al., 2003), nenhum dos marcadores de virulência de EAEC pesquisados foi encontrado na cepa Ec46/88, incluindo aqueles localizados no pAA da EAEC 042, tais como as toxinas EAST-1, Pet e o *cluster capU* (CZECZULIN et al., 1999). Resultados semelhantes foram observados em cepas de aEPEC do sorotipo O125:H6 que apresentam o padrão AA. Entretanto as cepas desse sorotipo não reagiram com a sonda *aatA* (BARROS et al., 2008).

A sonda desenvolvida por Baudry et al. (1990) para detecção de EAEC, inicialmente denominada CVD432 ou sonda AA, está associada à presença do plasmídeo pAA. De fato, as análises de perfil plasmideal da cepa Ec46/88 evidenciaram a presença de um único plasmídeo de massa semelhante ao presente na EAEC 17-2 (~60 MDa). Posteriormente, os ensaios de *Southern blot* revelaram a localização do gene *aatA* nesse plasmídeo. Este é o primeiro relato da presença de um plasmídeo albergando *aatA* em uma aEPEC.

Após a avaliação dos fatores de virulência de EPEC e EAEC foram pesquisados os genes que codificam adesinas de outros patótipos de *E. coli* diarreiogênica, na tentativa de identificar a adesina que medeia o padrão AA na cepa em estudo.

Adesinas são estruturas proteicas bacterianas que reconhecem e se ligam a receptores específicos presentes na superfície da célula hospedeira. As estruturas filamentosas, que são apêndices bacterianos não flagelares ancorados à membrana externa da bactéria são denominadas de pili ou fímbrias. Já as não fimbriais são proteínas de membrana externa. Essas estruturas exercem um papel fundamental no processo de adesão das *E. coli* diarreiogênicas.

Diversos genes que codificam adesinas descritas em outros patótipos de *E. coli* diarreiogênica, especialmente de EHEC, já foram detectados em aEPEC. Dentre eles *lpf* (*long polar fímbriae*), *iha* (*Vibrio cholerae Irg homologue adhesin*), *efa1* (*EHEC factor for adherence 1*), *toxB* (proteina ToxB envolvida na adesão), *ldaH* (*locus for diffuse adherence*), *paa* (*porcine A/E-associated protein*), *sfa* (fímbria S), *pap* (fímbria P) e *afa* (adesina afimbrial da família Dr) (AFSET et al., 2006; ROBINS-BROWNE et al., 2004; SCALETSKY et al., 2009; VIEIRA et al., 2001; VIEIRA et al., 2010).

Esses dados indicam que aEPEC apresenta uma estrutura genética que permite a aquisição de fatores de virulência de outros patótipos (BANDO et al., 2009). Por conta dessa característica, foi realizada a pesquisa de diversas adesinas relacionadas a outros patótipos de *E. coli* patogênicas. Dentre as adesinas pesquisadas foram detectados na Ec46/88 os genes da fímbria tipo I, Lpf e ECP.

A fímbria do tipo 1 está amplamente distribuída em *E. coli* e outras enterobactérias, exercem papel na patogênese da infecção urinária causada por UPEC e pertencem à categoria das fímbrias conhecidas como chaperona-*usher* (WAKSMAN; HULTGREN, 2009). As fímbrias do tipo I, expressas por UPEC, formam uma estrutura constituída por subunidades de FimA onde a adesina FimH se acopla (RUSSEL; ORNDORFF, 1992). Tanto os genes *fim*A como *fim*H foram detectados na cepa Ec46/88.

A fímbria tipo I participa do estabelecimento do padrão AA na EAEC 042 e em EAEC do sorotipo O128:H35 (MOREIRA et al., 2003). Entretanto, é inibida pela presença de manose (fímbria manose sensível) que é utilizada nos ensaios de adesão em células epiteliais cultivadas (RUSSEL; ORNDORFF, 1992). Dessa forma, podemos descartar o seu papel na adesão agregativa apresentada pela cepa do presente estudo, uma vez que todos os ensaios de adesão foram realizados na presença de manose.

Dentre as adesinas fimbriais de EHEC, está a fímbria polar longa (Lpf) similar à fímbria de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (TORRES et al., 2002). Coelhos e cordeiros foram utilizados como modelo animal de infecção para demonstrar que a fímbria LPF está envolvida na adesão inicial à célula hospedeira e à persistência bacteriana intestinal (NEWTON et al., 2004; TORRES et al., 2007). A fímbria LPF de EHEC, relacionada à fímbria do tipo 1 em nível de organização genética, facilita a adesão bacteriana às placas de Peyer presentes na mucosa do íleo no intestino delgado (BÄUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 1996). A cepa Ec46/88 apresentou o gene *lpfA*1 (A1-A), que codifica uma variante de LPF (TORRES et al., 2009).

Torres et al. (2009) identificaram diferentes variantes polimórficos do gene *lpfA*, denominados *lpfA1* e *lpfA2*. A variante *lpfA1* é composta por cinco diferentes tipos, que possuem várias sequências conservadas de nucleotídeos, enquanto a variante *lpfA2* apresenta 3 diferentes tipos polimórficos. Além disso, foi observado que as variantes polimórficas *lpfA1* e *lpfA*2 podem contribuir como marcadores de virulência em associação aos subtipos de intimina (TORRES et al., 2009). A variante *lpfA1* encontrada na cepa Ec46/88 foi descrita

como filogeneticamente relacionada aos genes de *lpfA* encontrados em EPEC (96-99% de identidade), onde o sorotipo representativo desse grupo seria o O127:H6. Os variantes *lpfA1* e *lpfA2* são muito prevalentes entre cepas de *E. coli* LEE-positivas, incluindo o sorotipo O157:H7 associadas à diarreia severa e/ou epidêmica (SZALO et al., 2002; TOMA et al., 2006; TORRES et al., 2004). Entretanto, não existem relatos associando a fímbria Lpf ao padrão AA, o que descarta o seu envolvimento com o padrão AA da cepa Ec46/88.

O gene *ecpA*, o qual faz parte do operon da fímbria ECP, também foi detectado na cepa Ec46/88. A fímbria ECP é uma adesina recentemente descrita (POUTTU et al., 2001; RENDON et al., 2007), produzida pela maioria dos patótipos de *E. coli*, incluindo cepas intestinais e extraintestinais. Originalmente descrita como Mat (*meningitis-associated temperature-dependent*) em uma cepa de *E. coli* associada à meningite (POUTTU et al., 2001), ECP é uma fímbria peritríquia longa de 4 nm de espessura, semi-flexível composta por subunidades de EcpA (RENDON et al., 2007). O gene *ecpA*, também conhecido como *yagZ*, foi descrito no genoma de EHEC O157:H7 (HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001), *E. coli* K12 (BLATTNER et al., 1997), UPEC (WELCH et al., 2002) e em *E. coli* associadas à meningites (POUTTU et al., 2001).

A fímbria ECP está presente em muitos dos isolados de *E. coli* diarreiogênica e parece agir em conjunto com a fímbria BFP durante a interação de tEPEC com a célula hospedeira (SALDAÑA et al., 2009). Recentemente, Scaletsky et al. (2010) relataram o achado do gene *ecpA* em cepas de aEPEC que apresentavam o padrão AL-L (SCALETSKY et al., 2010). ECP poderia ser uma adesina acessória que juntamente com outros fatores medeia essa adesão. Dados da literatura indicam a alta prevalência de ECP em cepas de aEPEC (HERNANDES et al., 2011; SCALESTSKY et al., 2010).

Os genes responsáveis pela produção da fímbria ECP estão presentes em um operon composto por cinco genes, conhecido como *ecpABCDE*, e por seu regulador *ecpR* (GARNETT et al., 2012). Todos esses genes foram detectados inicialmente por PCR na cepa Ec46/88 e posteriormente sequenciados por completo, demonstrando 99% de identidade com os genes do operon *ecp* na cepa protótipo E2348/69.

Em seguida foram pesquisados os genes que codificam as fímbrias AAF de EAEC. A pesquisa desses genes revelou a presença dos genes *aggDCB* do operon responsável pela biogênese da fímbria AAF/I, descrita na EAEC 17-2 (SAVARINO et al., 1994). Nessa cepa o operon é composto por cinco genes denominados *aggDCBA* (NATARO et al., 1993). Nataro et

al. (1992) estudando a cepa 17-2, relacionaram o fenótipo AA à presença de um plasmídeo que seria responsável pela biogênese da fímbria formada por feixes flexíveis, a qual denominaram AAF/I.

O gene *aggA* codifica a pilina da fímbria AAF/I, esse gene não foi inicialmente detectado na cepa Ec46/88 por PCR com iniciadores baseados na sequência desse gene da EAEC 17-2. Porém, *aggA* pôde ser detectado no plasmídeo de ~ 60 MDa através da técnica de *Southern-blot*. A presença de genes variantes para AAF/I já foram descritos na literatura (BHARDWAJ et al., 2006; RICH et al., 1999). Rich et al. (1999) descreveram uma variante denominada $aggA_{457}$. Esses autores relataram que algumas cepas de EAEC positivas para *aggA* em ensaios de *colony blot* não apresentaram amplificação desse gene por PCR com iniciadores baseados na cepa protótipo 17-2. O sequenciamento do gene *aggA* da cepa Ec46/88 revelou 99% de identidade com essa variante $aggA_{457.}$

Os outros genes que compõem o operon foram detectados normalmente pela técnica de PCR e *Southern-blot*, localizando-os também no mesmo plasmídeo de ~ 60 MDa onde *aatA* foi localizado. Esses genes foram posteriormente sequenciados por completo, evidenciando alta identidade com as sequências de *aggDCB* da EAEC protótipo 17-2. Conclui-se que a cepa Ec46/88 apresenta o operon de AAF/I com a variante $AggA_{457}$, codificados em um plasmídeo de ~60MDa.

Os genes que codificam essa fímbria estão organizados em duas regiões separadas por um fragmento de 9 kb. A região 2 contém o gene *aggR*, responsável pela regulação da expressão da fímbria (NATARO et al., 1993). AggR codifica uma proteína de 29,4 kDa que apresenta homologia com a família AraC/XylS de ativadores transcricionais. Essa família inclui as proteínas AraC, CfaR, Rns, ToxT, VirF e PerA (GOMES-DUARTE; KAPER, 1995). Membros dessa família possuem um alto conteúdo G+C (CARON et al., 1989). Na EAEC 042 AggR regula a expressão de pelo menos 44 genes, incluindo ele próprio, no início da fase logarítmica de crescimento (MORIN et al., 2013). O gene *aggR* é conhecido como o regulador global dos genes de virulência das EAEC, porém, não são todas as cepas de EAEC que albergam o regulador. Esse gene não foi detectado na cepa Ec46/88, nem pela técnica de PCR nem por hibridização com sonda de DNA em condições de alta estringência. Todas as cepas protótipo nas quais as fímbrias AAF foram descritas apresentam o regulador *aggR*, mas não como parte do operon responsável pela biogênese (BERNIER et al., 2002; BOISEN et al., 2008; ELIAS et al., 1999; NATARO et al., 1994; SAVARINO et al., 1994). No caso de AAF/I ser produzida na

cepa Ec46/88, a mesma pode ser regulada por uma variante de AggR ou mesmo por algum outro regulador da família AraC.

Com o intuito de avaliar o possível envolvimento de AAF/I e ECP no fenótipo AA da cepa Ec46/88, o presente estudo foi conduzido para a obtenção de mutantes nessas fímbrias.

Através de uma mutação polar no gene que codifica o *usher* de AAF/I foi possível verificar a participação da mesma na adesão apresentada pela cepa Ec46/88. A mutação no gene *aggC* bloqueou a montagem da fímbria e, consequentemente, houve significativa redução na adesão em células HeLa quando comparado com a cepa selvagem. Porém, o padrão agregativo não foi afetado, indicando que esta adesina não é a única responsável pelo fenótipo agregativo apresentado pela cepa Ec46/88.

O padrão AA pode ser mediado por múltiplas estruturas na mesma cepa, como na EAEC 042 onde o padrão AA é dependente das fímbrias AAF/II, tipo I e ECP (MOREIRA et al., 2003).

Apesar de não ter sido investigada a produção de AAF/I na cepa Ec46/88, devido à indisponibilidade de soro anti-AAF/I, os dado obtidos nos testes quantitativos de adesão levam a acreditar que essa fímbria seja produzida, uma vez que houve uma diferença significativa na adesão dos mutantes.

Além dos genes do operon da fímbria AAF/I, a cepa Ec46/88 alberga os genes envolvidos na biogênese da fímbria ECP. Rendon et al. (2007) detectaram ECP em cepas de *E. coli* patogênicas e não patogênicas. Através da construção de um mutante em *ecpA* na cepa EDL933 (EHEC), foi observada significativa redução da adesão em células epiteliais comparada com a cepa selvagem. Os autores ainda descreveram a alta prevalência (96% das cepas) do gene *ecpA* em cepas de *E. coli* intestinais, composta por *E. coli* da flora intestinal, EPEC, ETEC, EAEC, EHEC, EIEC e ainda por UPEC e *E. coli* aviária. Em EPEC, ECP parece atuar em conjunto com a fímbria BFP na formação e estabilização das microcolônias formadas no padrão de adesão AL (SALDAÑA et al., 2009). Em EAEC, ECP contribui na adesão agregativa de cepas que não apresentam as fímbrias AAF (AVELINO et al., 2010).

Uma vez que a fímbria ECP também pode ser acessória, ou até mesmo responsável pela expressão do fenótipo AA em cepas deficientes das fímbrias AAF, foi necessária a construção de um mutante que impedisse a produção desta fímbria, a fim de avaliar o seu papel na adesão AA apresentada pela cepa.

Através de uma mutação polar no gene que codifica o *usher* de ECP (*ecpC*) foi possível bloquear a montagem da fímbria. A cepa Ec46/88Δ*ecpC* apresentou um índice de adesão muito semelhante ao da cepa selvagem. Esses dados estão de acordo com os relatados por Avelino et al. (2010), onde a mutação no gene *ecpA* da cepa protótipo 042 não apresentou redução significativa comparada à cepa selvagem 042. Esses autores relataram que outra cepa mutante em *ecpA*, porém desprovida de qualquer fímbria AAF, apresentou uma redução significativa na adesão comparado à sua respectiva cepa selvagem.

A subunidade principal de ECP, a pilina, apresenta peso molecular de 21 kDa, e frequentemente anticorpos contra essa subunidade são utilizados para a detecção da produção de ECP em cepas de *E. coli* diarreiogênica (AVELINO et al., 2010; RENDON et al., 2007; SALDAÑA et al., 2009). Neste estudo não foi possível verificar a presença da subunidade de *ecpA* através de *immunoblotting* (dados não apresentados), mas existe indício de que esta fímbria seja produzida pela cepa Ec46/88 pois nas microscopias eletrônicas que foram realizadas as cepas selvagem e mutante em AAF/I foram observadas estruturas filamentosas conectando as bactérias, muito semelhantes às observadas nos trabalhos que relatam a estrutura da fímbria ECP (RENDON et al., 2007; SALDAÑA et al., 2009). Esses mesmos filamentos estavam ausentes no mutante em ECP na cepa Ec46/88.

Provavelmente a construção de duplo mutante em AAF/I e ECP reduziria ainda mais a adesão, com possível alteração do padrão AA. Além disso, a cepa Ec46/88 alberga o gene *eae*, que se mostrou funcional nos ensaios de análise da formação da lesão A/E. Dessa forma, a cepa Ec46/88 ainda apresentaria a adesão mediada pela adesina intimina. Um terceiro mutante em intimina permitirá análises mais precisas do papel de AAF/I e ECP na adesão da cepa Ec46/88.

A cepa Ec46/88 pertence ao sorotipo O142:H34, um dos 12 sorotipos clássicos de tEPEC reconhecidos pela OMS (WHO, 1987). Porém essa cepa apresenta características de EPEC e EAEC. Uma questão importante do presente estudo refere-se à origem genética da Ec46/88. Para responder a essa questão seria importante o sequenciamento do genoma dessa cepa, incluindo análises da relação do plasmídeo de ~ 60 MDa que ela alberga com os plasmídeos pAA de EAEC. Por outro lado, análises filogenéticas podem ajudar na compreensão dessa questão.

Diversos estudos procuram classificar a origem clonal de cepas tanto patogênicas como simbiontes de *E. coli* (AFSET et al., 2008; BANDO et al., 2009; ESCOBAR-PÁRAMO

et al., 2004; LACHER et al., 2007). A maioria deles distribui as cepas de *E. coli* entre os principais grupos filogenéticos: A, B1, B2 e D (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Em outro estudo mais recente seis grupos filogenéticos de *E. coli* foram descritos (A, B1, B2, C, D e E), onde cepas patogênicas e não patogênicas ficaram distribuídas em todos os seis grupos, enquanto as *E. coli* extraintestinais distribuíram-se nos grupos B2 e D (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004). Alguns demonstraram a clonalidade das aEPEC com as tEPEC e EHEC (REID et al., 2000). Outros associam os fatores de virulências encontrados nas cepas com os grupos filogenéticos. Lacher et al. (2007) pesquisaram em 129 cepas de EPEC a variação alélica de 3 genes (*eae, bfpA e perA*) relacionando essa variação à diferentes tipos de plasmídeo pEAF e ainda, classificaram essas cepas em quatro clusters: EPEC 1, EPEC 2, EPEC 3 e EPEC 4. Sendo que o grupo das EPEC 1 apresentou apenas cepas de EPEC típicas (O55, O127, O142) que apresentavam LEE inserida no locus de *selC*. Os outros três grupos continham cepas tanto de EPEC típicas quanto de atípicas, com diferenças nos antígenos flagelares apresentados. Esses autores demonstram que com a perda dos genes *bfpA* e *perA*, e possivelmente todo o pEAF, cepas de aEPEC evoluíram geneticamente das tEPEC.

Utilizando a metodologia de análise de sequenciamento de genes *housekeeping*, a cepa Ec46/88 foi inserida em uma árvore filogenética já construída com cepas de diferentes patótipos de *E. coli* diarreiogênicas (BANDO et al., 2009). Apenas três genes puderam ser utilizados para a construção da árvore juntamente aos dados anteriores de Bando et al. (2009). Contudo, foi possível classificar a cepa Ec46/88 no grupo filogenético B2, proximamente relacionada ao patótipo EPEC que inclui a tEPEC protótipo E2348/69. O grupo B2 apresenta grande homogeneidade sendo bastante constante dentro da árvore, ou seja, para a maioria das árvores consenso construídas a partir dessa análise, essas cepas permaneceram sempre juntas, não importando mais a quantidade de genes inseridos.

A técnica de *multi-locus sequence typing* baseia-se no estudo da variação da sequência de nucleotídeos dos fragmentos de múltiplos genes metabólicos dentro de uma mesma espécie bacteriana. Estes genes são altamente conservados e esta técnica permite descobrir múltiplos alelos variantes que caracterizam e classificam membros dentro de uma espécie bacteriana (COOPER; FEIL, 2004). O método de *bootstrap* baseia-se no arranjo aleatório do conjunto de dados para criar novas relações filogenéticas, chamado réplicas. O consenso de todas as árvores obtidas através das réplicas indica quais ramos estão melhores apoiados pelos dados.

O valor de *bootstrap* do grupo onde a Ec46/88 se localizou foi bastante alto, indicando a robustez do grupo.

Com esses resultados foi possível classificar a cepa como uma aEPEC que recebeu os genes *aatA* e o operon *agg* do plasmídeo pAA1 de EAEC. Esses dados corroboram as análises por ribotipagem de cepas do sorotipo O142:H34, incluindo tEPEC, aEPEC e a cepa Ec46/88 do presente estudo, mostrando que todas pertencem ao mesmo ribotipo (GHILARDI et al., 2003). Além disso, esses mesmos autores verificaram que a cepa Ec46/88 apresentava a região LEE inserida em *selC*. O sítio de inserção de LEE pode variar de acordo com a filogenia clonal da cepa, razão pela qual se pode inferir que evolutivamente essa cepa tem a mesma origem que a E2348/69, onde a região LEE foi descrita inserida em *selC* (McDANIEL et al., 1995).

Em resumo a cepa Ec46/88 possui a seguinte composição genética: presença da região LEE funcional e inserida em *selC*; ausência do pEAF, *bfpA* e da produção de BFP; presença do plasmídeo de ~ 60 MDa contendo os gene *aatA* e *aggDCBA*; presença do operon *ecpRABCDE*; além dos genes, *fimA*/*fimH* e *lpfA1*.

Provavelmente essa cepa de aEPEC tenha recebido por transferência horizontal alguns genes presentes no plasmídeo de virulência de EAEC, uma vez que as *E. coli* são micro-organismos extremamente versáteis, onde a aquisição e perda de fatores de virulência se torna muito comum através de transferência horizontal. De fato o operon *agg* é flanqueado por sequências de inserção (IS) que poderiam mediar essa transferência (NATARO et al., 1993). Cepas de aEPEC são altamente heterogêneas, relatos da literatura demonstram que a adesão relacionada à cepas de aEPEC possuem uma abordagem multifatorial na maioria das vezes, e a produção sincronizada de adesinas fimbriais e não fimbriais está envolvida nesse fenótipo (HERNANDES et al., 2011). A adesão bacteriana à célula hospedeira é um processo complexo e em muitos casos envolve a participação de diferentes adesinas. Todas podem atuar ao mesmo tempo ou em estágios distintos da infecção (BLATTNER et al., 1997).

A caracterização de cepas de *E. coli* e a correlação entre fatores de virulências e patótipos de *E. coli* diarreiogênicas tem se tornado desafiante em vista da grande combinação de fatores de virulência que algumas cepas específicas apresentam. O surto na Alemanha de O104:H4 é um exemplo da variabilidade das combinações dos genes de virulência derivados de dois diferentes patótipos. A complexidade desse surto foi atribuída à grande capacidade de adesão agregativa e formação de biofilme dessa cepa, características mediadas pela fímbria

AAF/I. Isso demonstra a importância de AAF/I como fator de virulência e a sua presença em cepas de outros patótipos de *E. coli* (MUNIESA et al., 2012).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a cepa Ec48/66 é uma aEPEC, com capacidade de causar a lesão A/E *in vitro* e que expressa o padrão de adesão agregativo mediado em parte por uma variante da fímbria AAF/I de EAEC, cujos genes estão presentes em um plasmídeo; e pela fímbria acessória ECP, que estaria colaborando na manutenção do padrão agregativo. Os resultados aqui obtidos também indicam que outra fímbria, ainda não caracterizada, participa do estabelecimento do padrão AA nesta cepa.

6 CONCLUSÕES

A cepa de *E. coli* diarreiogênica do sorotipo O142:H34 (Ec46/88):

- É uma EPEC atípica capaz de causar lesão A/E *in vitro*, filogeneticamente relacionada à cepa protótipo de EPEC típica E2348/69;

- Alberga um plasmídeo de ~60 MDa que contém o fragmento sonda AA (*aatA*) e os genes do operon que codifica as proteínas da biogênese da fímbria AAF/I, ambos encontrados na cepa protótipo de EAEC 17-2;

- Apresenta o padrão de adesão agregativo em células epiteliais cultivadas de caráter multifatorial, mediado em parte por uma variante da fímbria AAF/I ($AggA_{457}$) e minoritariamente pela fímbria de ECP. Adesinas acessórias ainda não caracterizadas participam desse fenótipo.

REFERÊNCIAS*

ABE, C. M.; SALVADOR, F. A.; FALSETTI, I. N.; VIEIRA, M. A.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MACHADO, A. M.; ELIAS, W. P.; HERNANDES, R. T.; GOMES, T. A. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic E. coli. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**., v. 52, p. 397-406, 2008.

ABE, M. C.; TRABULSI, L. R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DHABI, G.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M. R; TADDEI, C. R.; MARTINEZ, M. B.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enterophatogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*+ EAF- negative *stx*- genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.

ABREU, A. G.; BUERIS, V.; PORANGABA, T. M.; SIRCILI, M. P.; NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains. **Appl. Envirom**. **Microbiol**., v. 79, p. 411-414, 1992.

ADACHI, J. A.; JIANG, Z.D.; MATHEWSON, J. J.; VERENKAR, M. P.; THOMPSON, S.; MARTINEZ-SANDOVAL, F.; STEFFEN, R.; ERICSSON, C. D.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clin. Infect. Dis.,** v. 32, p. 1706-1709, 2001.

AFSET, J. E.; ANDERSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Phylogenetic background and virulence profile of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from a case control study using multilocus sequence typing and DNA microarray. **J. Clin. Microbiol.,** v. 46, p. 2280-2290. 2008.

AFSET, J. E.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSEN, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic Escherichia coli by DNA microarray analysis and PCR. **J. Clin. Microbiol.,** v. 44, n. 10, p. 3703-3711, 2006.

ALIKHANI, M. Y., MIRSALEHIAN, A.; ASLANI, M. M. Detection of typical and atypical anteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhea. **J. Med. Microbiol**., v. 55, p. 1159-1163, 2006.

ARANDA, K. R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol.,** v. 42, p. 5849-5853, 2004.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ARAÚJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.,** v. 45, p. 3396-3399, 2007.

ARENAS-HERNANDEZ, M. M.; MARTINEZ-LAGUNA, Y.; TORRES, A. G. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. **Curr. Gastroenterol. Rep.,** v.14, p. 386-394, 2012.

AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

AVELINO, F.; SALDANA, Z.; ISLAM, S.; MONTEIRO-NETO, V.; DALL'AGNOL, M.; ESLAVA, C. A.; GIRÓN, J. A. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, p. 440-448, 2010.

BAKHSHI, B.; FALLAHZAD, S.; POURSHAFIE, M. R. The occurance of atypical enterophatogenic Escherichia coli strains among children with diarrhea in Iran. **J. Infect. Chemother**., v. 19, p. 615-620, 2013.

BANDO, S. Y.; ANDRADE, F. B.; GUTH, B. E. C.; ELIAS, W. P.; MOREIRA-FILHO, C. A.; CASTRO, A. F. P. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 299, p. 22-30, 2009.

BARROS, S. F.; ABE, C. M.; ROCHA, S. P.; RUIZ, R. M.; BEUTIN, L.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. *Escherichia coli* O125ac:H6 encompasses atypical enteropathogenic *E. coli* strains that display the aggregative adherence pattern. **J. Clin. Microbiol**., v. 46, p. 4052-4055, 2008.

BATISSON, I.; GUIMOND, M. P.; GIRARD, F.; AN, H.; ZHU, C.; OSWALD, E.; FAIRBROTHER, J. M.; JACQUES, M.; HAREL, J. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of the attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infect. Immun**., v. 71, p. 4516-4525, 2003.

BAUDRY, B.; SAVARINO, S. J.; VIAL, P.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.,** v. 161, p. 1249-1251, 1990.

BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,** v. 93, p. 279-283, 1996.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a

sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.,** v. 70, p. 4302-4311, 2002.

BEUTIN, L.; KAULFUSS, S.; HEROLD, S.; OSWALD, E.; SCHMIDT, H. Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and housekeeping genes and pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.,** v. 43, n. 4, p. 1552-1563, 2005.

BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCK, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; PETERS, G.; KARCH, H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 11, p. 671-676, 2011.

BHAN, M. K.; RAJ, P.; LEVINE, M. M.; KAPER, J. B.; BHANDARI, N.; SRIVASTAVA, R.; KUMAR, R.; SAZAWAL, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. **J. Infect. Dis.,** v. 159, p. 1061-1064, 1989.

BHARDWAJ, R.; MAJUMDAR, S.; GANGULY, N. K.; TANEJA, N.; DUTTA, S.; RAMAMURTHY, T.; CHAKRABORTI, A. Characterization of adhesin variants in Indian isolates of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol**., v. 258, p. 274-283, 2006.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M. P.; VARELA, G.; GADEA, M. P.; SCHELOTTO, F.; GONZALES, E. A.; BLANCO, J. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (*muB* and *xiR*/*beta2B*). **J. Med. Microbiol**., v. 55, p. 1165-1174, 2006.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science,** v. 277, p. 1453-1462, 1997.

BOISEN, N.; STRUVE, C.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.,** v. 76, p. 3281-3292, 2008.

BOUCKENOOGHE, A. R.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; ADACHI, J.; MATHEWSON, J. J.; VERENKAR, M. P.; RODRIGUES, S.; STEFFEN, R. Markers of enteric inflammation in enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea in travelers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 62, p. 711-713, 2000.

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R. E. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet**, v. 365, p. 1147-1152, 2005.

BUERIS, V; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of

diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 102, p. 839-844, 2007.

BUGAREL, M.; MARTIN, A.; FACH, P.; BEUTIN, L. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. **BMC Microbiol**., v. 11, p. 1-10, 2011.

BRUNDER, W.; KHAN, A. S.; HACKER, J.; KARCH, H. Novel Type of Fimbriae Encoded by the Large Plasmid of Sorbitol-Fermenting Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H2. **Infect. Immun**., v. 69, p. 4447-4457, 2001.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups – A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 99, n. 6, p. 545-552, 2004.

CAMPOS, L. C. WHITTAM, T.S.; GOMES, T.A.T.; ANDRADE, J.R.C.; TRABULSI, L.R. *Eschrechia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3282-3288, 1994.

CARON, J.; COFFIELD, L. M.; SCOTT, J. R. A plasmid-encoded regulatory gene, rns required for expression of the CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 86, p. 963-967, 1989.

CHART, H.; SMITH, H. R.; ROWE, B. Enteroaggregative strains of *Escherichia coli* belonging to serotypes O126:H27 e O44:H18 express antigenically similar 18 kDa outer membrane-associated proteins. **FEMS Microbial. Lett.,** v. 132, p. 17-22, 1995.

CHAVEROCHE, M. K.; GHIGO, J. M.; D'ENFERT, C. A rapid method for eficiente gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Nucl. Acids Res.,** v. 28, n. 22, e97, 2000.

CHINA, B.; GOFFAUX F.; PIRSON V.; MAINIL J.Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 178, p. 177-118, 1999.

CLARKE, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P. E.; WILLIAMS, P. H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli* , a global pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 16, p. 365-378, 2003.

CLEARLY, J.; LAI, L. C.; SHAW, R. K.; STRAATMEN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M. S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimina. **Microbiology**, v. 150, p. 527-538, 2004.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71-87, 2012.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microb**., v. 66, p. 4555–4558, 2000.

COOPER, J. E.; FEIL, E. Multilocus sequence typing – what is resolved? **Trends Microbiol.,** v. 8, p. 12, 2004.

CONNELL, I.; AGACE, W.; KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.; MARILD, S.; SVANBORG, C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**., v. 93, p. 9827–9832, 1996.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. An adhesive factor in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.,** v. 3, p. 95-99, 1979.

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. **Lancet,** v. 337, p. 262-264, 1991.

CRAVIOTO, A.; TRUJILLO, F.; LÉON, L. A.; HÉRNANDEZ, J. M.; ESLAVA, C. Infections caused by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Gac. Med. Mex**., v. 132, p. 611-615, 1996.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol**., v. 8, p. 26–38, 2010.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli.* **Clin. Microbiol. Review**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

CZECZULIN, J. R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.,** v. 65, p. 4135-4145, 1997.

CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HANDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.,** v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DALMANN, T.; SMITH, G. P.; O'BRIEN, B.; CHATTAWAY, M. A.; FINLAY, D.; GRANT, K. A.; JENKINS, C. Characterization of a verocytotoxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O111:H21 strain associated with a household outbreak in Northern Ireland. **J. Clin. Microbiol.** , v. 50, p. 4116-4119, 2012.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 97, p. 6640-6645, 2000.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. **Human intestinal flora.** Academic Press, 1974. p. 36-43.

DEBROY, C.; BRIGHT, B. D.; WILSON, R. A.; YEALY, J.; KUMAR, R.; BHAN, M. K. Plasmid-coded DNA fragment developed as a specific gene probe for the identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 41, p. 393-398, 1994.

DEBROY, C.; YEALY, J.; WILSON, R. A.; BHAN, M. K.; KUM AR, R. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli.* **Infect. Immun.,** v. 63, p. 2873-2879, 1995.

DONNENBERG, M. S.; LAI, L. C.; TAYLOR, K. A. The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes secretion functions and remnants of transposons at its extreme right end. **Gene,** v. 184, p. 107-114, 1997.

DOS SANTOS, L. F.; GONÇALVES, E. M.; VAZ, T. M.; IRINO, K.; GUTH, B. E. Distinct pathotypes of O113 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals in Brazil. **J. Clin. Microbiol**., v. 45, n. 6, p. 2028-2030, 2007.

DOUGHTY, S.; SLOAN, J.; BENNETT-WOOD, V.; ROBERTSON, M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohaemorrhagic *Escherichia coli.* **Infect. Immun**., v. 70, p. 6767-6769, 2002.

DUDLEY, E. G.; ABE, C.; GHIGO, J. M.; LATOUR-LAMBERT; HORMAZABAL, J. C.; NATARO, J. P. An IncI1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.,** v. 74, p. 2102-2114, 2006a.

DUDLEY, E. G; THOMSON, N. R.; PARKHILL, J.; MORIN, N. P.; NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.,** v. 61, p. 1267-82, 2006b.

DULGUER, M.V.; FABBRICOTTI, S.H.; BANDO S.Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO U.; SCALETSKY I.C.A. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.,** v. 188, p. 1685-1694, 2003.

ELIAS, W. P.; BARROS, S. F.; MOREIRA, C. G.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T.A.T. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains among classical enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroups. **J. Clin. Microbiol.,** v. 40, p. 3540-3541, 2002a.

ELIAS, W. P. JR.; CZECZULIN, J.R.; HENDERSON, I.R.; TRABULSI, L.R.; NATARO. J.P. The organization of biogenesis genes for aggregative adherence fímbria II (AAF/II) defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.,** v. 181, p. 1779-1785, 1999.

ELIAS, W. P.; UBER, A. P.; TOMITA, S. K.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. T. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhea. **Epidemiol. Infect.,** v. 129, p. 49-55, 2002b.

ELLIOT, S. J.; WAINWRIGHT, L. A.; MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DENG, Y. K.; LAI, L. C.; MCNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.,** v. 28, p. 1-4, 1998.

ESCOBAR-PÁRAMO, P.; CLERMONT, O.; BLANC-POTARD, A. B.; BUI, H.; LE BOUGUENÉC, C.; DENAMUR, E. A specific genetic background is required for aquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli.* **Mol. Biol. Evol.,** v. 21, n. 6, p. 1085-1094, 2004.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCIA, F.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli.* **Infect. Immun.,** v. 66, p. 3155-3163, 1998.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 66, p. 281-298, 2012.

FANG, G. D.; LIMA, A. A. M.; MARTINS, C. V.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.,** v. 21, p. 137-144, 1995.

FASANO, A.; NORIEGA, F. R.; MANEVAL, D. R. JR.; CHANASONGCRAM, S.; RUSSEL, R.; GUANDALINI, S.; LEVINE, M. M. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine *in vivo* and *in vitro.* **J. Clin. Invest.,** v. 95, p. 2853-2861, 1995.

FRANKE, J.; FRANKE, S.; SCHIMIDT, H.; SCHWARZKOPF, A.; WIELER, L. H.; BALJER, G.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Nucleotide sequence analyses of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **J. Clin. Microbiol**., v. 32, n. 10, p. 2560-2463, 1994.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, L.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *E. coli* : more subversive elements. **Mol. Microbiol.,** v. 30, p. 911-921, 1998.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C. B.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L. R. Prevalence of diarrheagenic Escherichia coli in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 100, p. 359-363, 2005.

FREITAS, N. C. **Fímbrias Pil em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: caracterização e investigação do papel de PilS e PilV na adesão bacteriana.** 2012. 119 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FUJIYAMA, R.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for biofilm formation. **Curr. Microbiol.,** v. 56, p. 474-480, 2008.

GASSAMA-SOW, A.; SOW, P. S.; GUEYE, M.; GUEYE-N'DIAYE, A.; PERRET, J. L.; M'BOUP, S.; AIDARA-KANE, A. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhoea in Senegal. **J. Infect. Dis**., v. 189, p. 75-78, 2004.

GÁSCON, J.; VARGAS, M.; QUINTÓ, L.; CORACHÁN, M.; JIMENEZ DE ANTA, M.T.; VILA, J. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains as a cause of traveler's diarrhea: a case-control study. **J. Infect. Dis.,** v. 177, p. 1409-1412, 1998.

GARNETT, J. A.; MARTINEZ-SANTOS, V. I.; SALDANA, Z.; PAPE, T.; HAWTHRNE, H.; CHAN, J.; SIMPSON, P. J.; COTA, E.; PUENTE, J. L.; GIRON, J. A.; MATHEWS, S. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v., 109, p. 3950-3955, 2012.

GIOPPO, N. M. R.; ELIAS, W. P.; VIDOTTO, M. C.; LINHARES, R. E.; SARIDAKIS, H. O.; GOMES, T. A. T.; TRABULSI, L. R.; PELAYO, J. S. Prevalence of Hep-2 cells adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 190, p. 293-298, 2000.

GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B.; IRINO, K.; GOMES, T. A. Classifying *Escherichia coli.* **Emerg**. **Infect. Dis**., v. 12, p. 1297-1299, 2006.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S. Y.; SCHOOLNIK, G. K. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *E. coli.* **J. Bacteriol.,** v. 175, p. 7391-7403, 1993.

GIRÓN, J. A.; JONES, T.; MILLÁN-VELASCO, F.; CASTRO-MUNOZ, E.; ZARATE, L.; FRY, J.; FRANKEL, G.; MOSELEY, S. L.; BAUDRY, B.; KAPER, J. B.; SCHOOLNIK, G. K.; RILEY, L. W. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **J. Infect. Dis.,** v. 163, p. 507-513, 1991.

GIRÓN, J. A.; TORRES, A. G.; FREER, E.; KAPER, J. B. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Mol. Microbiol**., v. 44, p. 361-379, 2002.

GOMES-DUARTE, O. G.; KAPER, J. B. A plasmid encoded regulatory regions activates chromossomal *eae*A expression in enteropathogenic *Escherichia coli.* **Infect. Immun.,** v. 63, p. 1767-1776, 1995.

GOMES, T. A.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. Emerging enteropathogenic Escherichia coli strains . **Emerg. Infect. Dis.,** v. 10, p. 1851-1855, 2004.

GOMES, T. A. T.; RASSI, V.; MACDONALD, K. L.; RAMOS, S. R. T.; TRABULSI, L. R.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C.; CANDEIAS, J. A. N.; VEY, C.; TOLEDO, M. R. F.; BLAKE, P. A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infec. Dis.**, v. 164, p. 331-337, 1991.

GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ABE C. M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P. M.; RAMOS, S. R. T. S. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol.,** v. 36, p. 3609-3613, 1998.

GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; WACHSMUTH, I. K.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Serotype-specific prevalence of Escherichia coli strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.,** v. 160, p. 131-135, 1989.

GHILARDI, A. C. R.; GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P.; TRABULSI, L. R. Virulence factors of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O127 and O142. **Epidemiol. Infect.**, v. 131, p. 815-851, 2003.

GHOSAL, A.; BHOWMICK, R.; NANDY, R. K.; RAMAMURTHY, T. CHATTERJEE, N. S. PCR-based identification of common colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.,** v. 45, n. 9, p. 3068-3071, 2007.

GRAD, Y. H.; LIPSITCH, M.; FELDGARDEN, M.; ARACHI, H. M.; CERQUEIRA, G. C.; FITZGERALD, M.; GODFREY, P.; HASS, B. J.; MURPHY, C. I.; RUSS, C. et al. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,** v. 109, p. 3065-3070, 2012.

GREWAL, H. M.; VALVATNE, H.; BHAN, M. K.; VAN DJIK, L.; GAASTRA, W.; SOMMERFELT, H. A new putative fimbrial colonization factor, CS19, of human enterotoxigenic *Escherichia coli.* **Infect. Immun.,** v. 65, p. 507-513, 1997.

HAYASHI, T.; MARIKO, K.; OHNISHI, M.; ISHII, K.; YOKOYAMA, K.; HAN, C. G.; OHTSUBO, E.; NAKAYAMA, K.; MURATA, T.; TANAKA, M.; TOBE, T.; IIDA, T.; TAKAMI, H.; HONDA, T.; SASAKAWA, C.; OGASAWARA, N.; YASUNAGA, T.; KUHARA, S.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; SHINAGAWA, H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. **DNA Res**., v. 8, p. 11-22, 2001.

HARADA, T.; HIROI, M.; KAWAMORI, F.; FURUSAWA, A.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.,** v. 60, p. 154–155, 2007.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 254, p. 12-18, 2006.

HARRINGTON, S. M.; STRAUMAN, M. C.; ABE, C. M.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative Escherichia coli. **Cell. Microb**., v. 7, p. 1565-1578, 2005.

HENDERSON, I. R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Charactezation of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroagregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.,** v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends Microbiol.,** v. 6, p. 370-378, 1998.

HERNANDES, R. T.; VELSKO, I.; SAMPAIO, S. C. F.; ELIAS, W. P.; ROBINS-BROWNE, R. M.; GOMES, T. A. T.; GIRON, J. A. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Appl. Envirom. Microbiol.,** v. 77, n. 23, p. 8391-8399, 2011.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T. Na overview of atypical enterophatogenic *Escherichia coli.* **FEMS Microbiol. Lett**., v. 297, p. 137-149, 2009.

HICKS, S.; CANDY, D. C. A.; PHILIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* pediatric intestinal mucosa *in vitro*. **Infect. Immun.,** v. 64, p. 4751-4760, 1996.

HUANG, D. B.; MOHANTY, A.; DUPONT, H. L.; OKHUYSEN, P. C.; CHIANG, T. A review of emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.,** v. 55, p. 1303-1311, 2006.

HUANG, D. B.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children. **Semin. Pediatr. Infect. Dis**., v. 15, p. 266-271, 2004.

ITOH, Y.; NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; EZAKI, T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J. Clin. Microbiol.,** v. 35, p. 2546-2550, 1997.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A. M. G.; CALZADA, C. T.; NEME, S. N.; FERNANDES, S. A.; NAKARARA, L. K.; PÊSSOA, G. V. A. Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas durante o período de 1997- 1983, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** v. 44, p. 161-178, 1984.

IYODA, S.; TAMURA, K.; ITOH, K.; IZUMIYA, H.; UENO, N.; NAGATA, K.; TOGO, M.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H. 2000. Inducible stx2 phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86:HNM isolated from patients. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 191, p. 7-10, 2000.

JENKINS, C.; CHART, H.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; SMITH, H. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* of both typical and atypical strains. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 55, p. 13-19, 2006.

JIANG, Z. D.; GREENBERG, D.; NATARO, J. P.; STEFFEN, R.; DUPONT, H. L. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in intestinal travelers. **J. Clin. Microbiol.,** v. 40, p. 4185-4190, 2002.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130-133, 1996.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.,** v. 2, p. 123-138, 2004.

KAUFFMANN, F.; ORSKOV, F. **Die Bakteriologie der Escherichia coli-enteritis.** In: ADAM, A. (Ed.). Säuglings-Enteritis. Stuttgart, 1947. p. 1-41.

KOMANO, T. Shufflons: multiple inversion systems and integrons. **Annual Reviews Genetics**, v. 33, p. 171-191, 1999.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S. O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F.; FARUQUE, A. S.; ZAIDI, A. K.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J. B.; OMORE, R.; OUNDO, J. O.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ADEGBOLA, R. A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M. J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C. E.; MINTZ, E. D.; BERKELEY, L. Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-BROWNE, R.; LEVINE, M. M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, p. 209-222, 2013.

KNUTTON, S. Electron microscopy methods in adhesion. **Methods in Enzimol.,** v. 253, p. 145-58, 1995.

KNUTTON, S.; SHAW, R. K.; BHAN, M. K.; SMITH, H. R.; MCCONNELL, M. M.; CHEASTY, T.; WILLIAMS, P. H.; BALDWIN, T. J. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. **Infect. Immun.,** v. 60, p. 2083-2091, 1992.

KNUTTON, S., BALDWIN, T., WILLIAMS, P.H., MCNEISH, A.S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli.* **Infect. Immun**., v. 57, p. 1290-1298, 1989.

LACHER, D. W.; STEINSLAND, H.; BLANK, T. E.; DONNENBERG, M. J.; WHITTAM, T. S. Molecular evalution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 342-350, 2007.

LANATA, C. F.; FISCHER-WALKER, C. L.; OLASCOAGA, A. C.; TORRES, C. X.; ARYEE, M. J.; BLACK, R. E. Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. Global causes of diarrheal disease mortality in children < 5 years of age: a systematic review. **PLoS One**, v. 8, n. 9, e.72788, 2013.

LANE, M. C.; MOBLEY, H. L. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. **Kidney Int**., v. 72, p.19-25, 2007.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the *pap, afa,* and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol**., v. 30, p. 1189-1193, 1992.

LEVINE, M. M.; BERGQUIST, E. J.; NALIN, D. R.; WATERMAN, D. H.; HORNICK, R. B.; YOUNG, C. R.; SOTMAN, S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 27, p. 1119-1122, 1978.

MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.,** v. 92, p. 1664-1668, 1995.

MAIRENA, E. C.; NEVES, B. C.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorragic *Escherichia coli* serotypes. **Curr. Microbiol.,** v. 48, p. 412-418, 2004.

MARTINEZ, M. B.; TRABULSI, L. R. **Enterobacteriaceae**: microbiologia. São Paulo: Atheneu, 2008.

MATHEWSON, J. J.; SALAMEH, B. M.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; NELSON, A. C.; ARDUINO, R.; SMITH, M. A.; MASOZERA, N. HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and intestinal secretory immune response to human immunodeficiency virus (HIV) in outpatients with HIV-associated diarrhea. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.,** v. 5, p. 87-90, 1998.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELLA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.,** v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MONTEIRO-NETO, V.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A; GIRON, J. A. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cell. Microbiol.,** v. 5, p. 533-547, 2003.

MORABITO, S.; KARCH, H.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; SCHIMIDT, H.; MINELLI, F.; BINGEN, E.; CAPRIOLI, A. 1998. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. **J. Clin. Microbiol.,** v. 36, p. 840-842, 1998.

MOREIRA, F. C.; VIEIRA, M. A. M.; FERREIRA, A. J. P.; GIRÃO, D. M.; VAZ, T. M. I.; ROSA, C. P.; KNOBL, T.; IRINO, K.; FREYMÜLLER, E.; GOMES, T. A. T. *Escherichia coli* strains of serotype O151:H40 comprise typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains and are potentially diarrheagenic. **J. Clin. Microbiol.,** v. 46, p. 1462-1465, 2008.

MORIN, N.; SANTIAGO, A. E.; ERNEST, R. K.; GUILLOT, S. J.; NATARO, J. P. Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 81, n. 1, p. 122-132, 2013.

MOSSORO, C.; GLAZIOU, P.; YASSIBANDA, S.; LAN, N. T.; BEKONDI, C.; MINSSART, P.; BERNIER, C.; LE BOUGUÉNEC, C.; GERMANI, Y. Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEp-2 adherent *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic. **J. Clin. Microbiol.,** v. 40, p. 3086-3088, 2002.

MUNIESA, M.; HAMMERL, J. A.; HERTWIG, S.; APPEL, B.; BRÜSSOW, H. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a New challenge for microbiology. **J. Appl. Envirom. Microbiol**., v. 78, n. 12, p. 4065-4073, 2012.

NARA, J. M. **Adesinas fimbriais em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica:** prevalência e proteômica. 2012. 148 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NAKATA, N.; SASAKAWA, C.; OKADA, N.; TOBE, T.; FUKUDA, I..; SUZUKI, T.; KOMATSU, K.; YOSHIKAWA, M. Identification and characterization of *virK*, a virulence-associated large plasmid gene essential for intercellular spreading of *Shigella flexneri*. **Mol. Microbiol.,** v. 6, p. 2387-2395, 1992.

NATARO, J. P.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; BRAVO, N.; LEVINE, M. M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J. Infect. Dis.,** v. 152, p. 560-565, 1985.

NATARO, J. P.; DENG, Y.;COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S. J.; GUERS, L. D.; LEVINE, M. M.; TACKET, C. O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J. Infect. Dis.,** v. 171, p. 465-468, 1995.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; MANEVAL, D. R.; GERMAN, A. L.; MARTIN, W. C.; LEVINE, M. M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.,** v. 60, p. 2297-2304, 1992.

NATARO, J. P.; HICKS, S.; PHILLIPS, A. D.; VIAL, P. A.; SEARS, C. L. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Infect. Immun**., v. 64, p. 4761-4768, 1996.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 11, p. 142-201, 1998.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P. A.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.,** v. 16, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; GIRON, J. A.; SAVARINO, S. J.; KOTHARY, M. H.; HALL, R. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. **Infect. Immun.,** v. 61, p. 1126-1131, 1993.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli.* **J. Bacteriol.,** v. 176, p. 4691-4699, 1994.

NEVES, B. C.; SHAW, R. K.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Polymorphism within EspA filaments of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli.* **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2262-2265, 2003.

NEWTON, H. J.; SLOAN, J.; BENNETT-WOOD, V.; ADAMS, L. M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Contibuting of long polar fimbriae to the virulence of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli.* **Infect. Immun**., v. 72, p. 1230-1239, 2004.

NICHOLLS, L.; GRANT, T.H.; ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Mol. Microbiol**., v. 35, p. 275–288, 2000.

NISHI, J.; SHEIKH, J.; MIZUGUCHI, K.; LUISI, B.; BURLAND, V.; BOUTIN, A.; ROSE, D. J.; BLATTNER, F. R.; NATARO, J. P. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J. Biol. Chem.,** v. 278, p. 45680-45689, 2003.

NOWICKI, B.; LABIGNE, A.; MOSELEY, S.; HULL, R.; HULL, S.; MOULDS, J. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infect. Immun**., v. 58, p. 279-281, 1990.

NOWROUZIAN, F. L.; MONSTEIN, H. J.; WOLD, A. E.; ADLERBERTH, I. Effect of human milk on type 1 and P-fimbrial mRNA expression in intestinal Escherichia coli strains. **Lett. Applied Microbiol**., v. 40, p. 74-80, 2005.

OKEKE, I. N.; LAMIKANRA, A.; CZECZULIN, J.; DUBOVSKY, F.; KAPER, J. B.; NATARO, J. P. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. **J. Infect. Dis.,** v. 181, p. 252-60, 2000.

OKEKE, I. N.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Lancet,** v. 1, 304-313, 2001.

OKHUYSEN, P. C.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. **J. Infect. Dis.** , v. 15, n. 202, p. 503-505, 2010.

PARSOT, C. Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 252, p. 11-18, 2005.

PEDROSO, M. Z.; FREYMULLER, E.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. Attaching-effacing lesions and intracelular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups. **Infect. Immun.,** v. 61, p. 1152-1156, 1993.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G. R. D.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G.F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; PÓSFAI, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L; GROTBECK, E. J.; DAVIS, N. W.; LIM, A.; DIMALANTA, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHARANMAN, T. S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D. C.; WELCH, R. A.; BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature,** v. 409, p. 529–533, 2001.

POUTTU, R.; WESTERLUND-WIKSTROM, B.; LANG, H.; ALSTI, K.; VIRKOLA, R.; SAARELA, U.; SIITONEN, A.; KALKINEN, N.; KORHONEN, T. K. *matB*, a common fimbrillin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. **J. Bacteriol**., v. 183, p. 4727-4736, 2001.

PRAGER, R.; LANG, C.; AURASS, P.; FRUTH, A.; TIETZE, E.; FLIEGER, A. Two novel EHEC/EAEC hybrid strains isolated from human infections. **Plos One,** v. 9, n. 4, p. 1-10, 2014.

RAJAKUMAR, K.; LUO, F.; SASAKAWA, C.; ADLER, B. Evolucionary perspective on a composite *Shigella flexneri* 2a virulence plasmid-borne locus comprising three distinct genetic elements. **FEMS Microb. Lett.,** v. 144, p. 13-20, 1996.

REID, S. D.; HERBELIN, C.; BUMBAUGH, A. C.; SELANDER, R. K.; WHITTAM, T. S. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. **Nature**, v. 406, p. 64-67, 2000.

RENDON, M. A.; SALDANA, Z.; ERDEM, A. L.; MONTEIRO-NETO, V.; VAZQUEZ, A.; KAPER, J. B.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a commom pilus adherence factor for epitelial cell colonization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 10637-10642, 2007.

RICH, C.; BONTE-FAVRE, S.; SAPENA, F.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Characterization of enteropathogenic *E. coli* isolates. **FEMS Microbiol. Let.,** v. 173, p. 55-61, 1999.

RILEY, L. M.; TEMIS, R. S.; HLGERSON, S. D.; McGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M. Hemorrhagic colitis assocated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New Engl. J. Med.,** v. 308, p. 681-685, 1983.

ROBINS-BROWNE, R. M.; BORDUN, .; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V. R.; RUSSELL, J.; POOEDISANO, F.; LISTER, N. A.; BETTELHEIM, K. A.; FAIRLEY, C. K.;

SINCLAIR, M. I.; HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 10, p. 1797-1805, 2004.

ROCHA, S.P.D.; ABE, C.M.; SPERANDIO, V.; BANDO, S.; ELIAS, W.P. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* that contain functional LEE genes can be attaching and effacing negative in cultured epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 1833-1841, 2011.

RODRIGUES, J.; ACOSTA, V. C.; CANDEIAS, J. M.; SOUZA, L. O.; FILHO, F. J. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu. **Braz. J. Med. Biol. Res.,** v. 35, p. 1311-1318, 2002.

RODRIGUES, J; SCALETSKY, I. C. A.; CAMPOS, M L. C.; GOMES, T. A. T.; WHITTAM, T. S.; TRABULSI, L. R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infect. Immun.,** v. 64, p. 2680-2686, 1996.

ROSA, A. C.; MARIANO, A. T.; PEREIRA, A. M.; TIBANA, A.; GOMES, T. A. T.; ANDRADE, J. R. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Microbiol**., v. 47, p. 781-790, 1998.

RUSSEL, P. W.; ORNDORFF, P. E. Lesions in two Escherichia coli type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding. **J. Bacteriol.,** v. 174, p. 5923-5935, 1992.

SALDAÑA, Z.; ERDEM, A. L.; SCHÜLLER, S.; OKEKE, I. N.; LUCAS, M.; SIVANANTHAN, A.; PHILLIPS, A. D.; KAPER, J. B.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli.* **J. Bacteriol**., v. 191, p. 3451-3461, 2009.

SAMADDER, P.; XICOHTENCATL-CORTES, J.; SALDANA, Z.; JORDAN, D.; TARR, P. I.; KAPER, J. B.; GIRON, J. A. The *Escherichia coli ycbQRST* operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7. **Environ. Microbiol**., v. 11, p. 1815-26, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. H. **Molecular cloning:** a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SAMPAIO, S. C.; GOMES, T. A. T.; PICHON, C.; DU MERLE, L.; GUADAGNINI, S.; ABE, C. M.; SAMPAIO, J. L.; LE BOUGUENEC, C. The flagella of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain are required for efficient interaction with and stimulation of interleukin-8 production by enterocytes *in vitro.* **Infect. Immun.,** v. 77, p. 4406-4413, 2009.

SARANTUYA, J.; NISHI, J.; WAKIMOTO, N.; ERDENE, S.; NATARO, J.P.; SHEIKH, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K.; KAWANO, Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype

among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.,** v. 42, p. 133-139, 2004.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M.; GUADALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E. coli heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. USA,** v. 90, n. 7, p. 3093-3097, 1993.

SAVARINO, S. J.; FOX, P.; YIKANG, D.; NATARO, J. P. Identification and charcterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. **J. Bacteriol.,** v. 176, p. 4949-4957, 1994.

SAVARINO, S. J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; MOLINA, J.; CRAVIOTO, A.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M. K.; LEVINE, M. M.; FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.,** v. 173**,** p. 1019–1022, 1996.

SCALETSKY, I. C. A.; MICHALSKI, J.; TORRES, A. G.; DULGUER, M. V.; KAPER, J. B. Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesion found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli.* **Infection and Immunity,** v. 73, p. 4753-4765, 2005.

SCALETSKY, I. C. A.; ARANDA, K. R.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol.,** v. 48, n. 1, p. 302-306, 2010.

SCALETSKY, I. C.; ARANDA, K. R.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P.; MORAIS, M. B. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol**., v. 47, p. 3756-3759, 2009.

SCALETSKY, I. C. A.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L. B.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, H. S.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in northeast Brazil: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.,** v. 40, p. 645-648, 2002.

SCALETSKY, I. C.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.,** v. 45, p. 534-536, 1984.

SCAVIA, G.; STAFFOLANI, M.; FISICHELLA, S.; STRIANO, G.; COLLETTA, S.; FERRI, G.; ESCHER, M.; MINELLI, F.; CAPRIOLI, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **J. Med. Microbiol**., v. 57, p. 1141-1146, 2008.

SCHIMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIE, S.; HEESEMAN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 701-705, 1995.

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, A.; CARNIEL, E.; HEESEMANN, J. Prevalence of the high-pathogenicity island of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans**. Infect. Immun.,** v. 66, p. 480-485, 1998.

SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; SAID, B.; WILLSHAW, G. A.; STOKES, N.; ROWE, B. Use of gene probes and adhesion tests to characterize *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. **J. Med. Microbiol.,** v. 44, p. 438-443, 1996.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli.* **Clin. Microbial. Rev.,** v. 18, p. 264-292, 2005.

SILVA, R. M.; GIRALDI, R.; KELLER, R.; CAMPOS, L. C.; GUTH, B. E. Diffuse adherence, ST-I enterotoxin and CFA/IV colonization factor are encoded by the same plasmid in the *Escherichia coli* O29:H25 strain. **Braz. J. Med. Biol. Res**., v. 29, n. 8, p. 969-976, 1996.

SHEIKH, J.; CZECZULIN, J. R.; HARRINGTON, S.; HENDERSON, I. R.; LE BOUGUÉNEC, C.; GOUNON, P.; PHILLIPS, A.; NATARO, J. P. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli.* **J. Clin. Invest.,** v. 110, p. 1329-1337, 2002.

SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK**. Lancet,** v. 350, p. 814-815, 1997.

SMITH, H. R.; SCOTLAND, S. M.; WILLSHAW, G. A.; ROWE, B.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C. Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. **J. Infect. Dis.,** v. 170, p. 1610-1613, 1994.

SPENCER, J.; SMITH, H. R.; CHART, H. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from outbreaks of diarrhoeal disease in England. **Epidemiol. Infect.,** v. 123, p. 413-421, 1999.

STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.,** v. 177, p. 88-96, 1998.

SUZART, S.; GUTH, B. E. C.; PEDROSO, M. Z.; OKAFOR, U. M.; GOMES, T. A. T. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 201, p. 163-168, 2001.

SZALO, I. M.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; PIÉRARD, D.; BALL, H.; MAINIL, J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. **Res. Microbiol**., v. 153, p. 653-658, 2002.

TARR, C. L.; BILGE, S. S.;VARY, J. C.; JELACIC, S.; HABEEB, R. L.; WARD, T. R.; BAYLOR, M. R.; BESSER, T. E. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-

conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infect. Immun.,** v. 68, p. 1400-1407, 2000.

TATSUNO, I.; HORIE, M.; ABE, H.; MIKI, T.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; TAGUCHI, H.; KAMIYA, S.; HAYASHI, T.; SASAKAWA, C. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. **Infect. Immun**., v. 69, p. 6660–6669, 2001.

TAYLOR, K. A.; LUTHER, P. W.; DONNENBERG, M. S. Expression of the EspB protein of EPEC within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. **Infect. Immun.,** v. 67, p. 120-125, 1999.

TENNANT, S. M.; TAUSCHEK, M.; AZZOPARDI, K.; BIGHAM, A.; BENNETT-WOOD, V.; HARTLAND, E. L.; QI, W.; WHITTAM, T. S.; ROBINS-BROWNE, R. M. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 117, 2009.

THRELFALL, E. J.; ROWE, B.; FERGUSON, J. L.; WARD, L. R. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolated in Britain. **J. Hyg.**, v. 97, p. 419-426, 1986.

TOBE, T.; HAYASHI, T.; HAN, C. G.; SCHOOLNIH, G. K.; OHTSUBO, E.; SASAKAWA, C. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. **Infect. Immun.,** v. 67, p. 5455-54632, 1999.

TOMA, C.; HIGA, N.; IYODA, S.; RIVAS, M.; IWANAGA, M. The Long Polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic E. coli and in the standard E. coli collection of reference (ECOR) strains. **Res. Microbiol.,** v. 157, p. 153-161, 2006.

TORRES, A. G.; BLANCO, M.; VALENZUELA, P.; SLATER, T. M.; PATEL, S. D.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; BARRIGA, X. F.; BLANCO, J. E.; GOMES, T. A.; VIDAL, R.; BLANCO, J. Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. **J. Clin. Microbiol.,** v. 47, p. 2442-2451, 2009.

TORRES, A. G.; GIRON, J. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; BLATTNER, F. R.; AVELINO-FLORES, F.; KAPER, J. B. Identification and characterization of lpfABCC'DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun**., v. 70, p. 5416-5427, 2002.

TORRES, A. G.; KANACK, K. J.; TUTT, C. B.; POPOV, V.; KAPER, J. B. Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 238, p. 333-344, 2004.

TORRES, A. G.; MILFLORES-FLORES, L.; GARCIA-GALLEGOS, J. G.; PATEL, S. D.; BEST, A.; LA RAGIONE, R. M.; MARTINEZ-LAGUNA, Y.; WOODWARD, M. J.

Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. **Int. J. Med. Microbiol.,** v. 297, p. 177-185, 2007.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER, J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infect. Immun.,** v. 73, p. 18-29, 2005.

TSEN, H. Y.; JIAN, L. Z. Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin II and shiga-like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water. **J. Appl. Microbiol**., v. 84, p. 585-592, 1998.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infec. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

TZIPORI, S.; MONTANARO, J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; VIAL, P.; GIBSON, R. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infect. Immun.,** v. 60, p. 5302-5306, 1992.

UBER, A. P.; TRABULSI, L. R.; IRINO, K.; BEUTIN, L.; GHILARDI, A. C. R.; GOMES, T. A. T.; LIBERATORE, A. M. A.; CASTRO, A. F. P.; ELIAS, W. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 256, p. 251-257, 2006.

VALLE, G. R. F; GOMES, T. A. T; IRINO, K.; TRABULSI, L. R. The tradicional enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroup O125 comprises serotypes which are mainly associated with the category of enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 152, p. 95-100, 1997.

VELARDE, J. J.; VARNEY, K. M.; INMAN, K. G.; FARFAN, M.; DUDLEY, E.; FLETCHER, J.; WEBER, D. J.; NATARO, J. P. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli.* **Mol. Microbiol.,** v. 66, p. 1123-1135, 2007.

VIAL, P.A.; ROBINS-BROWNE, R.; LIOR, H.; PRADO, V.; KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MANEVAL, D.; ELSAYED, A.; LEVINE, M.M. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli,* a putative agent of diarrheal disease. **J. Infect. Dis.,** v. 158, n. 1, p. 70-79, 1988.

VIEIRA, M. A.; ANDRADE, J. R. C.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C. P.; DIAS, A. M. G.; RAMOS, S. R. T. S. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.,** v. 183, p. 762-772, 2001.

VIEIRA, M. A.; SALVADOR, F. A.; SILVA, R. M.; IRINO, K.; VAZ, T. M.; ROCKSTROH, A. C, GUTH, B. E.; GOMES, T. A. Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 1452-1455, 2010.

WAI, S. N.; TAKADE, A.; AMAKO, K. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 135, p. 17-22, 1996.

WAKSMAN, G.; HULTGREN, S. J. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. **Nature Rev. Microbiol**., v. 7, p. 765-774, 2009.

WELCH, R. A.; BURLAND, V.; PLUNKETT, G.; REDFORD, P.; ROESCH, P.; RASKO, D.; BUCKLES, E. L.; LIOU, S. R.; BOUTIN, A.; HACKETT, J.; STROUD, D.; MAYHEW, G. F.; ROSE, D. J.; ZHOU, S.; SCHWARTZ, D. C.; PERNA, N. T.; MOBLEY, H. L. DONNENBERG, M. S.; BLATTNER, F. R. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 99, p. 17020–17024, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Programe for control of diarrheal diseases (CDC/83.3 Rev 1). **Manual for laboratory investigations of acute enteric infections.** Genebra, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics**. Genebra: WHO Press, 2012.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; SATO, H.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.; ENOMOTO, K. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. **J. Clin. Microbiol.,** v. 40, p. 294–297, 2002.

XICOHTENCATL-CORTES, J. ; MONTEIRO-NETO, V. ; LEDESMA, M. A. ; JORDAN, D. M. ; FRANCETIC, O. ; KAPER, J. B. ; PUENTE, J. L. ; GIRON, J. A. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J. Clin. Invest**., v. 117, p. 3519-3529, 2007.